

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Seroprevalencia del virus de la rinoneumonitis equina en
caballos (*Equus caballus*) del Perú**

TESIS

Para optar el título profesional de médico veterinario

AUTOR

David Javier Galindo Huamán

Lima-Perú

2014

*A mi abuelo Don Roberto Galindo Moreno, que el Señor guarde en su gloria, quien
partió mucho antes de poder darle esta gran satisfacción.*

*A Dios por tenerme siempre en su gloria, por permitir que siempre me sienta amado y
seguro en su compañía eterna.*

*A Javier Galindo y Cristina Huamán, mis padres, por esta lucha continua a mi lado
y su apoyo y amor incondicional siempre.*

*A Ana Galindo y Lorena Galindo, mis hermanas, cómplices y más arduas críticas a lo
largo de esta corta vida que venimos compartiendo como familia.*

*A Andrés Huamán, Modesta León y Otilia Ruiz, mis queridos abuelos, por darme
ejemplos de vida y forjar mi carácter y sentido de la vida.*

*A Carmen Arias, mi amiga incondicional y gran soporte emocional y académico no
solo en este trabajo, sino a lo largo del poco tiempo que aún nos conocemos. Por los
consejos, las críticas, el cariño, la sinceridad y momentos compartidos.*

*A Viviana T., Marilia R., Lourdes M., Marita L., Rosse Z., Yanira L., Cesar del C.,
Enrique G., Luis B., Julio T., Christopher P., Gregorio M., Kamilio R., Jorge M. por
estos primeros 8 años de amistad y todos los demás que la vida nos permita cultivar.*

*A cada uno de los miembros de la familia de la FMV-UNMSM, por todos los
momentos compartidos, el amor hacia esta noble carrera, las enseñanzas, los errores
corregidos, los consejos dados y recibidos, las semanas veterinarias, cachimbadas y
demás. Siempre los llevo en el corazón.*

A la Dra. Hermelinda Rivera Gerónimo, por confiar en mi persona para la realización de este trabajo, por sacar y exigir lo mejor de mí, por ser tan excelente profesional como persona y sobre todo por su gran sabiduría.

A la Dra. Mercy Ramirez, por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo, por sus enseñanzas, consejos y regaños, sin los cuales hubiera significado un atraso mayor de la culminación de este trabajo.

Al Dr. Juan More y al Dr. Alberto Manchego, por su compañerismo, orientación y apoyo al momento de realizar el trabajo en laboratorio, lectura de resultados y análisis de datos.

Al Dr. Jorge Mantilla por el gran soporte epidemiológico y estadístico que ofreció a este trabajo. Sus enseñanzas son gratas y valiosas.

A Vicente Mercado, por la amistad y las idas y venidas al camal en busca de muestras para el cultivo celular, por el apoyo en laboratorio y las pichangas para quitar el estrés.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICOS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ANTECEDENTES	3
2.2 VIRUS	3
2.2.1 Taxonomía	3
2.2.2 Características	5
2.2.3 Estructura	5
2.3 LOS HOSPEDADORES	7
2.3.1 Inmunidad del hospedador	7
2.3.1.1 Inmunidad innata y adaptativa	8
2.3.1.2 Inmunidad de mucosas	8
2.3.1.3 Distribución de tejidos linfoides en el tracto respiratorio	10
2.3.1.4 Respuesta inmune a virus	12
2.4 PATOGÉNESIS	15
2.4.1 Vías de transmisión	15
2.4.2 Infección del tracto respiratorio	15
2.4.3 Viremia	16
2.4.4 Aborto	17
2.4.5 Enfermedad neonatal	21
2.4.6 Enfermedad neurológica	21
2.4.7 Latencia	22
2.5 DIAGNÓSTICO	23
2.5.1 Aislamiento viral	24

2.5.2	Detección del Antígeno Viral	24
2.5.2.1	Inmunofluorescencia directa	24
2.5.2.2	Tinción con Inmunoperoxidasa	24
2.5.2.3	Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	25
2.5.2.4	Histopatología	26
2.5.3	Detección de Anticuerpos	26
2.5.3.1	Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima (ELISA)	26
2.5.3.2	Neutralización viral	27
2.6	EPIDEMIOLOGÍA	27
2.6.1	Prevalencia	27
2.7	CONTROL Y PREVENCIÓN	28
2.7.1	Vacunación	30
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1	MUESTRAS DE SUERO	32
3.1.1	Tamaño de Muestra	33
3.2	MATERIALES	37
3.2.1	Reactivos y equipos	37
3.2.2	Células	37
3.2.3	Cepa viral	37
3.3	MÉTODOS	37
3.3.1	Detección de anticuerpos	37
3.3.2	Análisis de Datos	38
IV.	RESULTADOS	40
V.	DISCUSIÓN	45
VI.	CONCLUSIONES	49
VII.	LITERATURA CITADA	50
VIII.	APÉNDICE	62

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la seroprevalencia del virus Herpes Equino tipo 1 (VHE-1) / virus Herpes Equino tipo 4 (VHE-4), en caballos de diferentes departamentos del Perú. Se colectaron muestras de suero ($n=825$) de caballos mayores a 6 meses de edad entre machos y hembras de apariencia normal dedicados a distintas actividades como caballo de carrera, caballo peruano de paso, caballo de deporte, caballo de trabajo o tiro, para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VHE-1/VHE-4 mediante la prueba de neutralización viral. El $48.9 \pm 3.4\%$ ($403/825$) de las muestras tuvieron anticuerpos contra el VHE-1/VHE-4. Los anticuerpos fueron detectados en los caballos procedentes de todos los departamentos con prevalencias similares, con la única excepción de Madre de Dios con un 0% ($0/5$) de seroprevalencia. Los títulos de anticuerpos tuvieron un rango entre 1:2 a $>1:256$, siendo los títulos de 1:2 a 1:8 presentes en el 58.6% de las muestras, los de 1:16 a 1:64 en el 29.5% y los títulos de 1:128 a $> 1:256$ en el 11.9% de las muestras. La prueba de regresión logística indicó que la variable sexo no constituye un factor de riesgo para la presentación de anticuerpos contra el VHE-1/VHE-4. En cuanto al tipo de actividad, los caballos de carrera, caballos peruano de paso y los dedicados al deporte constituyeron factores de riesgo de 8.8, 3.2 y 2.3 veces más de tener anticuerpos contra el VHE-1/VHE-4, respectivamente en comparación con los hallazgos en caballos de trabajo. Con respecto al lugar de procedencia, la región del centro del país constituye un factor de riesgo de 3.7 veces más, en comparación con la región nor-este del país.

Palabras clave: equinos, rinoneumonitis equina, virus herpes equino tipo 1, anticuerpos, neutralización viral, Perú.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the seroprevalence of the Equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) / Equine Herpesvirus type 4 (EHV-4), in horses from the different Peruvian departments. Serum samples (n=825) from horses older than six months of age, between males and females apparently healthy, engaged in various activities such as race horse, Peruvian Paso horse, sport horse, working horse, for detection of neutralizing antibodies against EHV-1/EHV-4 by virus neutralization technique were collected. Antibodies against EHV-1/EHV-4 were detected in $48.9 \pm 3.4\%$ (403/825) of the samples. Antibodies were detected in horses from all departments with similar prevalences with the only exception of Madre de Dios, with 0% (0/5). The antibody titers ranged between 1:2 to $> 1:256$, with titers of 1:2 to 1:8 present in 58.6% of samples, 1:16 to 1:64 in the 29.5% of samples, and titers from 1:128 to $> 1:256$ in 11.9% of samples. Logistic regression test indicated that sex variable did not constitute a risk factor for presentation of EHV-1/EHV-4 antibodies. Regarding the type of activity, the racehorses, Peruvian Paso horses, and sport horses, they constituted risk factors 8.8, 3.2 and 2.3 times more, to have antibodies against EHV-1/EHV-4, respectively in comparison with findings in work horses. Regarding the place of origin, the country's central region constituted a risk factor 3.7 times more compared with the north-eastern region of the country.

Key words: equine, equine rhinopneumonitis, equine herpes virus type 1, antibodies, virus neutralization, Peru.

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

Tabala 1: Mecanismos de defensa del tracto respiratorio.	9
Cuadro 1: Distribución por departamento y tipo de actividad de los caballos ubicados en la región Nor-Este del país.	32
Cuadro 2: Distribución por departamento y tipo de actividad de los caballos ubicados en la región Centro del país.	33
Cuadro 3: Distribución por departamento y tipo de actividad de los caballos ubicados en la región Sur-Este del país.	33
Cuadro 4: Estadísticas para la distribución de predios y cantidad de animales a muestrear de acuerdo a la población real por departamentos según el INEI (1994).	36
Cuadro 5: Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos de los departamentos de la región Nor-Este del Perú.	41
Cuadro 6: Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos de los departamentos de la región Centro del Perú.	41
Cuadro 7: Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos de los departamentos de la región Sur-Este del Perú.	42
Cuadro 8: Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos según sexo.	42
Cuadro 9: Seroprevalencia del virus de la Rinoneumonitis Equina en caballos según su actividad mediante la prueba de neutralización viral. Lima 2012-2013.	44
Cuadro 10: Distribución de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la Rinoneumonitis Equina de los caballos reactivos según tipo de actividad (n°= 403). Lima, 2012 – 2013.	44
Cuadro A1: Distribución de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la Rinoneumonitis Equina de los caballos reactivos según procedencia (n°= 403). Lima, 2012 – 2013	63

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICOS

FIGURA 1: Iniciación de la respuesta inmune de mucosas.	11
FIGURA 2: Tejidos linfoides del tracto respiratorio superior del equino.	13
FIGURA 3: Diagrama de representación de la patogénesis del VHE-1, cepa Ab4.	19
GRÁFICO 1: Comparación de seroprevalencia del virus de la Rinoneumonitis Equina entre departamentos del Perú.	43

I. INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con una población de 2'175,730 équidos de las cuales 1'062,462 son caballos (*Equus caballus*) y 1'013,576 son burros y mulas (INEI, 1994). La población de caballos comprende animales criollos y de raza. Los caballos criollos utilizados como medio de transporte, en labores agrícolas y los caballos de raza dedicados a actividades deportivas o de exhibición, como los caballos peruanos de paso, de equitación, carrera, etc. En todos los países del mundo los caballos cumplen diversos roles en el aspecto social, pecuario y económico (Goodwin, 1999; Gordon, 2001), a pesar de ello las informaciones de la situación sanitaria son escasas.

Los caballos como todas las especies animales son susceptibles a infecciones por agentes bacterianos o virales y que pueden afectar al sistema respiratorio, reproductivo y nervioso. Algunos de estos agentes virales son los virus herpes equino tipo 1 (VHE-1) y virus herpes equino tipo 4 (VHE-4), causantes de la rinoneumonitis equina (RNE) y pérdidas fetales. La RNE es una de las enfermedades virales más importantes en la producción equina mundial por las pérdidas económicas que ocasionan (Boelaert et al., 2000; Patel y Heldens, 2005).

Los VHE-1 y VHE-4 son miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* que afecta a los caballos domésticos de todas las edades y razas a nivel mundial (OIE, 2012). El VHE-1

y VHE-4 son dos agentes virales inmunológicamente relacionados, aunque molecularmente diferentes. EL VHE-1 es el principal causante de abortos, muerte temprana de neonatos, problemas respiratorios y mieloencefalopatías (Van Maanen, 2002; Patel y Heldens, 2005; Pusterla et al., 2009). Y aunque la ocurrencia de la Mieloencefalopatía por VHE-1 es esporádica y de manifestación poco común, puede causar severas pérdidas como lo ocurrido recientemente en escuelas de equitación, hipódromos y hospitales veterinarios a lo largo de Norteamérica y Europa (Kohn et al., 2006; Henninger et al., 2007; Pusterla et al., 2009). Por otro lado, el virus VHE-4 es el agente primario de procesos respiratorios caracterizados por rinofaringitis, traqueobronquitis y ocasionalmente causante de abortos (Ellis et al., 1995).

En el Perú la RNE fue reportada durante brotes de abortos en caballos de carrera (Rivera et al., 1975; Rivera et al., 1997) por aislamiento viral y serología en caballos principalmente de la costa (Ríos et al., 2002), indicando que la enfermedad está presente en la población de caballos del país. Dado que la RNE no es restrictiva para el movimiento interno de los caballos, la infección podría estar distribuida a nivel nacional, por lo que el presente estudio tuvo por objetivo determinar la seroprevalencia del virus de la rinoneumonitis equina en caballos de los 24 departamentos del país.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTECEDENTES.

El VHE-1 fue reconocido como causante de abortos por primera vez en Kentucky EE.UU. y desde entonces es una amenaza para el desarrollo de la industria equina (Gilkerson et al., 1999a). El VHE-1 y VHE-4 están muy relacionados inmunológicamente, por lo que fueron considerados como subtipos del mismo virus hasta 1981. Hasta entonces los sinónimos de “virus del aborto equino” para el VHE-1 subtipo 1 y “virus de la rinoneumonitis equina” para el VHE-1 subtipo 2 eran universalmente aplicados (Van Maanen, 2002). Posteriores estudios moleculares han demostrado diferencias genéticas entre estos dos agentes, siendo designados luego como VHE-1 y VHE-4 en 1988 (Roizmann et al., 1992; Van Maanen, 2002).

2.2 VIRUS

2.2.1 Taxonomía

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, del acrónimo inglés International Comité on Taxonomy of Virus) modificó la taxonomía del Orden *Herpesvirales* dividiendo a la familia *Herpesviridae* en 3 nuevas familias: *Herpesviridae* (la cual conserva sus 3 subfamilias originales: Alfaherpesvirinae, Betaherpesvirinae y Gammaherpesvirinae, aunque con cambios en los géneros y especies), *Alloherpesviridae* y

Malacoherpesviridae, con inclusión de nuevos géneros y especies dentro de estas (Davison et al., 2009; Johnson y Baines, 2011).

La taxonomía de los VHE-1 y VHE-4 no se ha visto modificada, siendo consideradas aún miembros de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae* y género *Varicellovirus*, grupo taxonómico al que también pertenecen otros 15 virus como el virus herpes porcino tipo 1 o virus de la enfermedad de Aujeszky, el virus herpes bovino tipo 1, el virus herpes humano tipo 3 (agente de la Varicela Zoster), entre otros (Johnson y Baines, 2011).

Así mismo existen otros virus herpes equino, teniendo un total de siete tipos más, aparte de los tomados en cuenta en este estudio. Entre estos se tiene al Virus Herpes Equino tipo 2 (VHE-2) conocido originalmente como citomegalovirus equino, aunque gracias al secuenciamiento de su genoma ahora se sabe que pertenece a la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, al género *Percavirus*, asociado a la producción de queratoconjuntivitis, enfermedad respiratoria, neumonía y faringitis, fiebre, nódulos linfáticos agrandados e inapetencia (Léon et al., 2008; Torfason et al., 2008). El Virus Herpes Equino tipo 3 (VHE-3), como agente del exantema coital equino, una enfermedad predominantemente de transmisión sexual, no invasiva, autolimitante y extendida en muchas poblaciones de equinos en todo el mundo a forma de pústulas y úlceras en las mucosas peniana, prepucial, vulvar y vaginal. El virus herpes equino 5 (VHE-5) también perteneciente a la subfamilia *Gammaherpesvirinae* y al género *Percavirus*, ha sido aislado del tracto respiratorio equino (Wilkes, 2013).

Así también tenemos otros virus herpes equinos que han sido aislados de asnos. Entre estos tenemos al virus herpes equino 6 (VHE-6) perteneciente a la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, especie tentativa para el género *Varicellovirus* y conocido como asasine herpesvirus 1 (virus herpes del asno 1); al virus herpes equino 7 (VHE-7) perteneciente a la subfamilia *Gammaherpesvirinae* que no tiene género asignado, también conocido como asasine herpesvirus 2 (virus herpes del asno 2); y al virus herpes equino 8 (VHE-8, perteneciente a la subfamilia *Alfaherpesvirinae* y género *Varicellovirus*, conocido como

asasine herpesvirus 3 (virus herpes del asno 3). Por otro lado tenemos al virus herpes equino 9 (VHE-9), un alfaherpesvirus, del género *Varicellovirus*, que genéticamente se parece al VHE-1 y que fue aislado de una Gacela de Thomson. Este último, causa leve o ninguna enfermedad en los equinos, siendo sugerida la cebra como su hospedador y reservorio natural. El VHE-9 produce patogenicidad neurotrópica en otras especies (no equinas) siendo asociado con encefalitis en jirafas y osos polares (Wilkes, 2013).

2.2.2 Características

El VHE-1 es la mayor causa de enfermedad respiratoria, aborto perinatal (las denominadas tormentas de abortos por los brotes infecciosos) y ocasionalmente, de signos neurológicos (mieloencefalopatías) en caballos (Crabb y Studdert, 1995; Walker et al., 1999). Mientras que el VHE-4 es mayormente conocido por su relación con las infecciones respiratorias que ocurren principalmente en animales jóvenes y muy esporádicamente por ser causante de aborto (mayormente en incidentes individuales) y problemas neurológicos.

El VHE-1 ha sido aislado de epitelio nasal, turbinas nasales, faringe, tráquea, bronquios, bronquiolos, pulmón, cerebro, tiroides, útero, conjuntiva, linfonódulos submandibulares e inguinales, riñones, endotelio del epidídimo y testículo, semen y útero en gestación (Tearle et al., 1996; Walker et al., 1999). También ha sido aislado de pulmón, hígado, bazo, timo y glándulas adrenales de potrillos cuyas madres estaban infectadas (Whitwell y Blunden, 1992; Walker et al., 1999). Y, gracias a la técnica de tinción de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia, ha sido encontrado en células endoteliales de endometrio, placenta, vena umbilical y principales vasos fetales (Walker et al., 1999).

2.2.3 Estructura

Los VHE-1 y VHE-4 son virus ADN de cadena doble con genomas colineales (Cullinane et al., 1988; Telford et al., 1998), cuyos tamaños aproximados son de 150 kbp y 145 kbp, respectivamente (Telford et al., 1998). Así mismo son virus que poseen una envoltura glicoproteínica, la cual juega un papel importante en la replicación viral de los mismos, mediando la unión y entrada a las células. Esta actúa como determinante crítico del tropismo, patogénesis e inducción de la respuesta inmune humoral e inmune celular,

motivo por el cual sirve como blanco para la neutralización viral (Ostlund, 1993). Las proteínas asociadas a la envoltura viral son un total de once (gK, gH, gL, gG, gI, gE, gC, gB, gM, gp300 y gD), siendo las más abundantes de este grupo las 5 últimas (Ríos et al., 2002).

Como se mencionó previamente, las glicoproteínas de la envoltura juegan un papel importante en la replicación viral. Esto según estudios realizados en virus del Herpes Simple 1 (VHS-1), usual modelo de replicación para los virus de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, que permiten sugerir que los alfaherpesvirus poseen una fijación lábil primaria mediante la gC, la cual es seguida por fijaciones más estables de gB y gD. Posteriormente la gD interactúa con un complejo que contiene gH/gL, y junto con gB activan los eventos de fusión, que permiten el ingreso de la cápside a la célula (Rajcani y Vojvodova, 1998; Csellner et al., 2000). De acuerdo con su conservación a lo largo de todas las subfamilias de herpesvirus, la gB y el complejo gH/gL son indispensables para la replicación viral, mientras que las otras cumplirían un papel auxiliar. Siendo demostrado que la gD del VHE-1 es necesaria para el ingreso del virus y la fusión célula-célula (Csellner et al., 2000).

Se debe tener en cuenta que debido al mayor conocimiento de la estructura genómica de estos dos virus se logró su clasificación en VHE-1 y VHE-4, a pesar de su estrecha relación inmunológica debido a la alta reacción cruzada que hay entre los anticuerpos policlonales de ambos. Dicha reacción cruzada tampoco permitía el adecuado diagnóstico diferencial entre animales infectados con VHE-1, VHE-4 o ambos, mediante técnicas serológicas. No obstante, Crabb y Studdert (1993) mostró que la secuencia prevista de la región gG del VHE4 es significativamente diferente de la región correspondiente en el VHE1, lo cual fue posteriormente revalidado en el trabajo realizado por Telford et al (1998). De esa manera, con la identificación de epítomos altamente específicos de tipo, presentes en los extremos C de la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína G (gG) homólogas de VHE-4 y VHE-1, es que se ha logrado una diferencia diagnóstica entre ambos agentes (Crabb y Sttudet, 1993; Crabb et al, 1995).

Estos epítomos comprenden regiones correspondientes a las moléculas gG y abarcan los aminoácidos 287-382 de la gG del VHE-4 y 288-350 de la gG del VHE-1. Estas regiones fueron expresadas en *E. coli* como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST) y como antígenos, los productos de la expresión fueron capaces de distinguir anticuerpos policlonales de estos virus estrechamente relacionados en Western Blot y ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Crabb et al., 1995). Cabe mencionar que en la actualidad también hay técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) muy sensibles, capaces de distinguir entre estos agentes. Estas técnicas de diagnóstico serán tratadas a profundidad más adelante.

2.3 LOS HOSPEDADORES

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla fundamentalmente mediante la presentación de antígenos por parte de los linfocitos ubicados a lo largo de la submucosa del tracto respiratorio (siendo relativamente escasos en las vías respiratorias y lumen alveolar), con el posterior desarrollo de defensas específicas a dichos antígenos. El complemento total de la respuesta linfocitaria está presente o es rápidamente reclutado del conjunto de linfocitos sistémicos, junto con las adaptaciones únicas del sistema inmune de mucosas que desempeñan una respuesta crítica en todos los aspectos de la inmunología respiratoria y están basadas en el rol regulador de los subconjuntos de células T-helper, los cuales modulan respuestas inmunes a través de la secreción de citoquinas (Lunn et al., 2006).

2.3.1 Inmunidad del hospedador

Según Dixon y McGorum (1997) el sistema inmune del tracto respiratorio de los equinos los protege un área de alrededor de 2,000 m² de microorganismos innumerables, partículas y agentes nocivos que son inhalados en un estimado de 100,000 litros de aire a diario. Es así que se hace imprescindible el entendimiento de la inmunidad respiratoria de esta especie, para intentar comprender como es que el VHE-1 y VHE-4 pueden causar tanto daño.

El sistema inmune respiratorio comparte todos los componentes de respuesta inmunológica encontrados a lo largo del resto del cuerpo, pero también tiene características únicas del Sistema Inmune de Mucosas (Lunn et al., 2006).

2.3.1.1 Inmunidad innata y adaptativa

Los mecanismos de defensa respiratoria son complejos, integrando respuestas que incluyen barreras mecánicas, venenos químicos, neutrófilos y macrófagos del sistema inmune innato. Las vías respiratorias altas y bajas y el espacio alveolar, cada uno tiene diferentes mecanismos de defensa (tabla 1) (Pilette et al., 2001; Lunn et al., 2006).

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa e inherente al individuo, es así que confiere una protección constante contra potenciales invasores del organismo, enfrentando las continuas amenazas mediante el reclutamiento de componentes celulares como lo son los neutrófilos polimorfonucleares hacia las vías respiratorias y dando soporte a los tejidos. Todo esto se da gracias a una compleja comunicación molecular a través de la producción y liberación de citoquinas por parte de las células respiratorias, llegando estas incluso a producir también el reclutamiento de células mieloides fagocíticas y linfocitos, que a posterior servirán como células presentadoras de antígenos en pos de la acción de la respuesta de inmunidad adaptativa.

2.3.1.2 Inmunidad de mucosas

Las adaptaciones para maximizar la absorción y el intercambio de las superficies de mucosa vuelven vulnerables a estos tejidos ante la invasión de patógenos. Pero esto es confrontado por el sistema inmune de mucosas, que consiste en tejido linfoide organizado y disperso, estrechamente asociado con la superficie epitelial de la mucosa (Mestecky et al., 2003; Lunn et al., 2006). El sistema inmune de mucosas mantiene la vigilancia a lo largo del área de superficie externa más largo del cuerpo, pudiendo generar respuesta inmune en un área específica y transferirla mediante el mismo sistema inmune de mucosas a través de linfocitos que son programados para migrar a los sitios efectores regionales (Lunn et al., 2006).

Tabla 1. Mecanismos de defensa del tracto respiratorio		
<i>Mecánico</i>	<i>Inmunidad Innata</i>	<i>Inmunidad Adaptativa</i>
Tracto Respiratorio Superior (Nasofaringe y Laringe)		
<ul style="list-style-type: none"> • Epitelio ciliado nasal, orofaríngeo y sinusal; estornudo. • Cuerdas vocales. • Mucosidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Complemento. • Proteasas. • Lactoferrina. 	<ul style="list-style-type: none"> • IgA secretora e IgM en la capa mucosa (principales clases de Ig), en lámina propia y en tránsito a través del compartimiento endosomal de las células del epitelio respiratorio. • Subclases de IgG (IgGa e IgGb) en la capa mucosa y en la lámina propia. • Complemento total de subconjuntos de linfocitos, incluyendo células CD4 inflamatorias y Linfocitos T citotóxicos (LTC o CTL, acrónimo para el inglés Cytolytic T Lymphocytes) en tejido linfoide organizado (tonsila) y disperso en la mucosa.
Tracto Respiratorio Inferior (árbol traqueobronquial)		
<ul style="list-style-type: none"> • Limpieza mucociliar. • Impacción sobre ramas bronquiales y tos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutrófilos reclutados. • Macrófagos (alveolares?). 	<ul style="list-style-type: none"> • IgA secretora e IgM como en el tracto respiratorio superior, más el incremento de cantidades de IgG. • Complemento total de subconjuntos de linfocitos como en el tracto respiratorio superior, tejido linfoide organizado como asociado a bronquios.
Parénquima alveolar (alvéolos e intersticio pulmonar)		
<ul style="list-style-type: none"> • Ninguno 	<ul style="list-style-type: none"> • Productos surfactantes. • Células fagocíticas incluyendo macrófagos alveolares residentes y neutrófilos reclutados y sus productos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfocitos parenquimatosos y linfocitos reclutados en caso de respuesta inflamatoria.

Adaptada de Lunn et al., 2006; Pilette et al., 2001

La inmunoglobulina A secretora (sIgA) es la más importante de este sistema inmune de mucosas, contando con adaptaciones únicas que le permiten migrar afuera sobre las superficies mucosas y conferir protección al organismo sobre bacterias y virus mediante

exclusión inmune, es decir, se une a estos impidiendo su unión a las superficies mucosas y su posterior ingreso al organismo.

Para una variedad de enfermedades equinas, en especial las infecciones respiratorias virales, la respuesta del sistema inmune de mucosa puede ser el tipo más efectivo de protección inmune. En adición para regular esta gigantesca estrategia de defensa, el sistema de mucosas debe distinguir entre alimentos y otros antígenos contra los cuales la respuesta inmune sería un desastre (Lunn et al., 2006).

2.3.1.3 Distribución de tejidos linfoides en el tracto respiratorio

La coordinación de la respuesta inmune de mucosas depende de la organización del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, acrónimo para el inglés Mucosa-associated Lymphoid Tissue), los principales ejemplos son las tonsilas faríngeas (nasofaringe y orofaringe) y las placas de Peyer intestinales. El MALT consiste de folículos linfoides que contienen linfocitos B comprometidos con la producción de IgA, rodeados por áreas de linfocitos T interfoliculares con células presentadoras de antígeno y vénulas endoteliales altas, con un epitelio asociado a folículo superpuesto (Lunn et al., 2006). El MALT no cuenta con conductos linfáticos aferentes por lo cual los linfocitos inmaduros llegan por extravasación desde las vénulas endoteliales altas hacia los sitios de inducción (Fig. 1). Una vez que haya contacto con el antígeno, por las células presentadoras de antígeno, los linfocitos ya cebados saldrán del sitio de inducción vía aferentes linfáticos hasta llegar a circulación y posteriormente a los sitios efectores de mucosa donde se extravasarán y formarán parte de las poblaciones de los linfocitos intra-epiteliales y de la lámina propia de la mucosa respiratoria. De esta forma quedan listos para su posterior diferenciación y ataque contra la presencia de antígenos específicos.

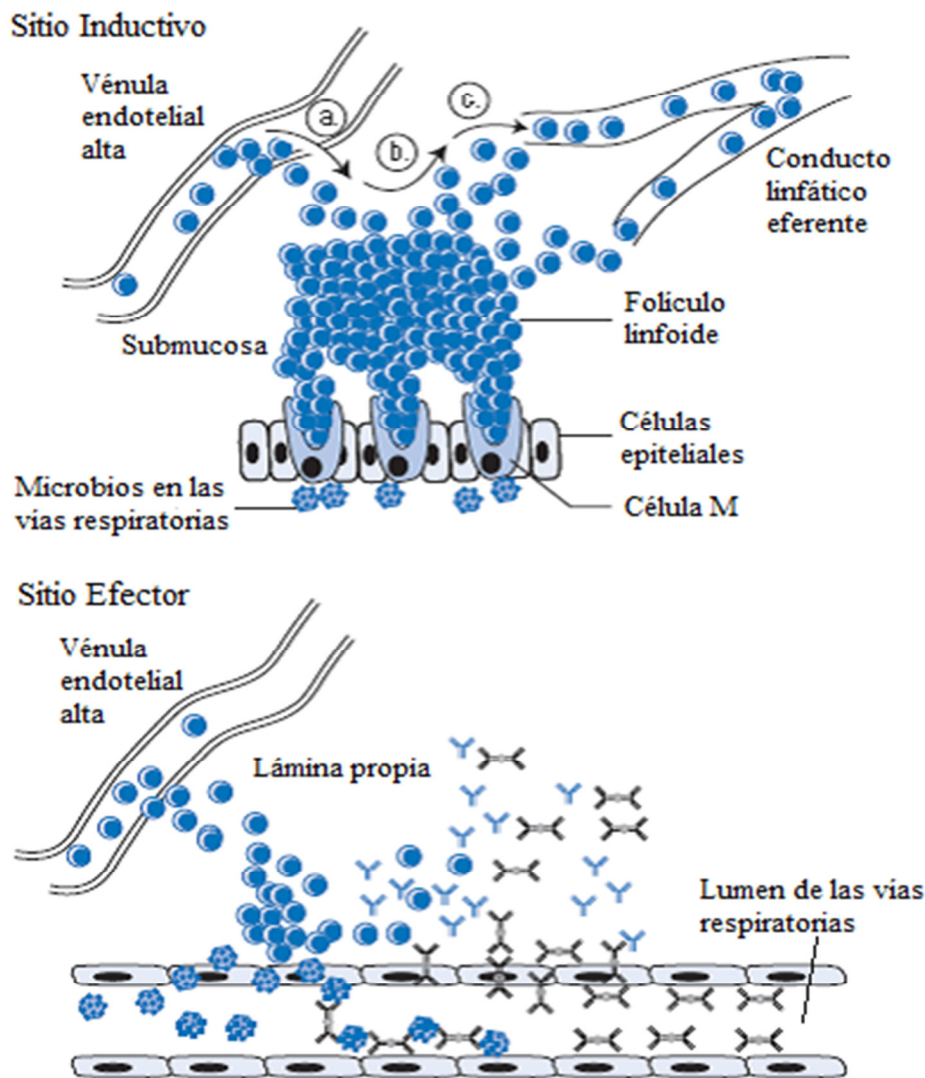


Fig. 1. Iniciación de la respuesta inmune de mucosas. Las respuestas inmunes de mucosas respiratorias se originan típicamente después de un encuentro antigénico en sitios inductivos, tales como las tonsilas de la nasofaringe y orofaringe en el caballo. Linfocitos inmaduros entran en los sitios inductivos desde las vénulas endoteliales altas vía el endotelio cuboidal especializado de esos vasos en respuesta a las señales moleculares específicas. Antígenos, tales como los microbios, son absorbidos por las células M, las cuales son parte del epitelio asociado a folículos especializados presente en estos sitios. El material antigénico es transportado a través

de las células M y la presentación de antígenos a los linfocitos B y T es realizada por las células dendríticas en los tejidos subyacentes. El folículo linfoide subyacente está compuesto primariamente por linfocitos B, rodeados por áreas de linfocitos T. Linfocitos B específicos a antígeno se ven comprometidos primariamente a la producción de IgA en estos sitios, aunque algunos linfocitos B productores de IgG son también generados. Posteriormente la población de linfocitos cebados sale del sitio inductivo vía eferentes linfáticos, llegando eventualmente a circulación sanguínea a través del ducto torácico. Después estas células transitan hacia vénulas endoteliales altas de sitios efectores a lo largo del epitelio respiratorio y se extravasan para formar la población de linfocitos intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia, y dar origen los agregados linfoides. Posterior a ello, el encuentro con el antígeno resulta en la diferenciación terminal de células plasmáticas, produciendo IgA primariamente, aunque algunas células plasmáticas IgG son formadas también. La IgG está en gran medida restringida a tejidos, pero la IgA secretora es transportada a la superficie del epitelio respiratorio donde este puede agregar a organismos infecciosos

Adaptación (Lunn et al., 2006).

Así mismo los tejidos linfoides en el caballo se encuentran distribuidos de forma compleja y adecuada. Según Mair et al. (1987, 1988a,b) el tejido linfoide asociado al tracto respiratorio del caballo se puede organizar en cinco niveles:

- *Linfocitos luminales libres* en la mucosa respiratoria que recubre los agregados linfoides subepiteliales.
- *Linfocitos intraepiteliales* dispersos por todo el epitelio respiratorio, aunque agrupados en la base del epitelio que recubre la mucosa de los nódulos linfoides.
- *Linfocitos aislados en la lámina propia* presentes a lo largo del tejido conectivo subepitelial, principalmente en áreas rodeando los nódulos linfoides.
- *Linfocitos agregados* en paquetes densos presentes cerca a los ductos de las glándulas serosas en la mucosa nasal y conformando los nódulos linfoides subepiteliales a lo largo de los bronquios.
- *Tejido linfoide nodular*, que en la nasofaringe y orofaringe puede tener un linfoepitelio especializado que lo recubre para recepción de antígeno y su procesamiento, como en el caso de las tonsilas.

Estas últimas son un tejido nodular linfoide muy complejo y el caballo posee todas las formas de este tejido que se puedan reconocer en otras especies (Fig. 2).

2.3.1.4 Respuesta inmune a virus

Según lo dicho anteriormente, la primera respuesta inmune en actuar será la innata, que tratará de controlar la infección viral hasta que la respuesta adaptativa pueda ejercer una acción efectiva sobre el agente infeccioso. En la inmunidad innata se debe remarcar el rol fundamental que tienen el sistema de complemento, células fagocíticas mononucleares y citoquinas. Resaltando a los interferones tipo1 (IFN- α y IFN- β) y al factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), por ejercer una acción antiviral directa en el tracto respiratorio. Los interferones tipo 1 son inducidos rápidamente por invasión viral e inducen enzimas celulares que interfieren con la replicación viral y regulan la presentación de antígeno (Lunn et al., 2006). El IFN- α es producido por macrófagos y el IFN- γ por las células

infectadas con virus. El TNF- α es producido por una variedad de células y mediante citólisis o apoptosis mata células infectadas.

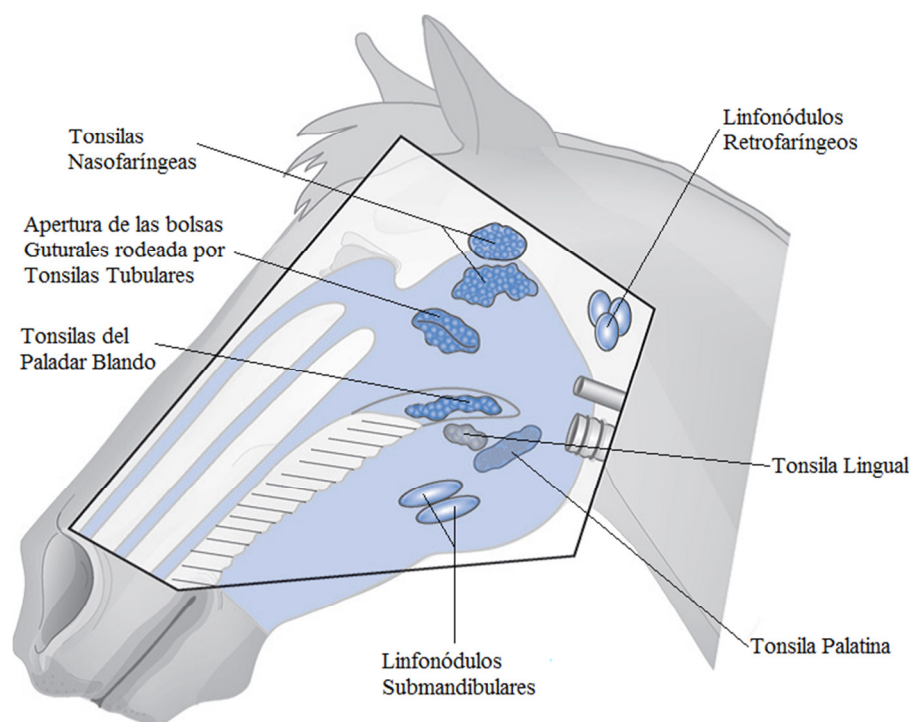


Fig. 2. Tejidos linfoides del tracto respiratorio superior del equino. Las tonsilas nasofaríngeas son estructuras bilaterales en la raíz nasofaríngea dorsolateral y son las masas más grandes del tejido linfóide en el tracto respiratorio de caballos de todas las edades. Los agregados linfoides son comunes en la mucosa adyacente. Las tonsilas tubulares rodean el operculum (apertura de la bolsa gutural). Las tonsilas palatinas se extienden longitudinalmente a lo largo de cada lado de

la orofaringe en la base de la lengua. Inmersa dentro de la base de la lengua está la tonsila lingual. Mientras la tonsila del paladar blando consiste en cadenas de nódulos linfoides extendiéndose longitudinalmente a lo largo del centro del paladar blando. El drenaje linfático regional es vía los linfonódulos retrofaríngeos y los linfonódulos submandibulares

Adaptación (Lunn et al., 2006).

La respuesta inmune adaptativa del tracto respiratorio equino no solo se basa en la acción de la IgG circulante, sino que también se apoya en otros factores como lo son la producción local de anticuerpos (IgA) en el tracto respiratorio o la inmunidad celular. Esto según estudios realizados por Hannant et al (1988), donde en infecciones naturales por virus de la Influenza Equina se desarrolló inmunidad total por alrededor de 6 meses e inmunidad parcial por alrededor de un año, a pesar de que los títulos de anticuerpos a esta infección son indetectables hasta 12 meses post infección. Estudios sobre las defensas del hospedador han demostrado la importancia de ambas, la respuesta de anticuerpos locales en prevención de infecciones y la inmunidad mediada por células para la limpieza viral y

recuperación de infecciones (Bender y Small, 1992). Según Mazanec et al. (1992) la IgA no solo neutraliza virus en las secreciones respiratorias, sino que también puede neutralizar virus intracelulares, como la inmunidad celular.

A diferencia de infecciones de corta duración del tracto respiratorio, patógenos más invasivos como VHE-1 requieren una respuesta inmune adicional para su control (Slater y Hannant 2000; Lunn et al., 2006). Una vez que VHE-1 ha invadido la lámina propia del tracto respiratorio se asocia rápidamente a célula para luego ser protegida de la inmunidad mediada por anticuerpos (Allen et al., 1999). Por otro lado, es conocido que los LTC medidos a nivel sistémico juegan un papel crítico en la inmunidad contra VHE-1 (O'Neill et al., 1999). Investigaciones recientes indican que estos LTC efectores pueden también ser encontrados en el epitelio respiratorio (Breathnach et al., 2006) y estar entre los mecanismos de defensa más importantes para patógenos virales invasivos como VHE-1 (Lunn et al., 2006).

Estudios de Análisis de Diluciones Limitantes han mostrado que la frecuencia de LTC, precursores específicos para VHE-1, tiene correlación con la protección generada de la infección por VHE-1 (O'Neill et al., 1999; Kydd et al., 2003; Soboll et al., 2006). Debido a que los LTC reconocen péptidos extraños derivados de proteínas virales y expresados sobre la superficie de células presentadoras de antígenos en combinación con las moléculas Clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH o MHC, acrónimo para el inglés Major Histocompatibility Complex) altamente polimórficas (Soboll et al., 2010), que en el equino su equivalente es llamado Antígenos Leucocitarios Equinos (ALE o ELA, acrónimo para el inglés Equine Leucocyte Antigen).

De esta forma se concluye que debido a que el VHE-1 inicia su infección en la superficie de la mucosa, se requiere una combinación de respuestas de mucosa, anticuerpos sistémicos y LTC para un control inmunológico exitoso de la infección por VHE-1 (Allen et al., 1999; Kondo et al., 2004).

2.4 PATOGENESIS

2.4.1 Vías de transmisión

Los virus de la rinoneumonitis ingresan vía respiratoria, en forma de aerosoles por tos y estornudos. Así mismo por contacto directo con fetos abortados, fluidos y membranas fetales infectadas. Hay que tener en cuenta que las yeguas infectadas que han abortado o cuyas crías han muerto van a transmitir el virus vía respiratoria, al igual que las crías infectadas. Por otro lado el contagio indirecto se da por contacto con un medio ambiente contaminado (el virus puede sobrevivir por varias semanas una vez que ha sido esparcido por el animal).

2.4.2 Infección del tracto respiratorio

Los problemas respiratorios son de mayor frecuencia en animales destetados y los que bordean el año de edad, mayormente en temporada de otoño e invierno. No obstante, los caballos adultos pueden enfermarse también y son más probables, que los jóvenes, de fungir como portadores que transmiten el virus sin mostrar signos clínicos.

Los signos de enfermedad respiratoria son fiebre ligera, tos y descarga nasal. Clásicamente, el periodo de incubación es descrito entre 1 a 2 días, pero algunas veces se extiende a 10 días post infección (PI) (Ostlund et al., 1991; Walker et al., 1999). Y suele tener una resolución usual de los signos dentro de 12 días PI. En estos casos el daño severo se da cuando la infección del tracto respiratorio se acompaña de una infección bacteriana secundaria, llegando en algunos casos a ser fatal entre los animales más jóvenes si no se toman las medidas adecuadas. En caballos infectados experimentalmente, los signos respiratorios llegan a su máxima expresión del 4to al 5to día PI y son caracterizados por rinofaringitis, la cual es inicialmente serosa pero luego se vuelve mucopurulenta cuando la infección procede; así como por traqueobronquitis, rinoneumonitis, linfadenomegalia, depresión e inapetencia (McCulloch et al., 1993; Walker et al., 1999). Ya cuando se da una reinfección los signos clínicos respiratorios a menudo son leves o ausentes (Van Maanen, 2002).

2.4.3 Viremia

Rápidamente posterior a la infección del tracto respiratorio se da la invasión viral del subepitelio y la infección de células permisivas (endotelio de los vasos sanguíneos y linfáticos) dentro de la cubierta de la lámina propia. Poco después, la infección se disemina a células mononucleares y el endotelio dentro de los nódulos linfáticos asociados dentro del tracto respiratorio de los cuales emergen los leucocitos infectados hacia la circulación vascular sanguínea y linfática, dando como resultado la viremia asociada a células. Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) que portan el agente VHE-1 son los monocitos y linfocitos T, incluyendo ambos linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. Esta viremia permite la dispersión del virus vía sistémica a sitios de replicación adicionales, como se verá posteriormente en los casos abortos y al endotelio de vasos sanguíneos endometriales (Allen et al., 1999).

El periodo de diseminación del virus desde la nasofaringe de caballos infectados experimentalmente se ha reportado con una variación entre 5 y 14 días PI, con mayor eliminación por el día 12 PI (Tewari et al., 1993; Walker et al., 1999), estableciéndose la viremia asociada a linfocitos, con una persistencia de hasta 21 días, siendo directamente responsable de la diseminación de VHE-1 al útero preñado y a la médula espinal, lo que resulta en los casos de abortos o mieloencefalitis (Allen, 2008; Soboll et al., 2010). Sin embargo el aislamiento viral puede extenderse más allá de la recuperación clínica (Chong y Duffus, 1992; Walker et al., 1999).

Caballos infectados experimentalmente desarrollan leucopenia, debido tanto a la neutropenia y a la linfopenia de células T, durante la infección VHE-1 aguda y una linfocitosis de células B durante el periodo de convalecencia (McCulloch et al., 1993; Walker et al., 1999). Así mismo, McCulloch et al. (1993) postularon que la linfocitopenia podría ser debido a que las células T quedan atrapadas en los linfonódulos al drenar la infección o quizás debido a una infección selectiva y consecuente destrucción de células T por VHE-1.

Desde que el VHE-1 es una viremia puede durar hasta alrededor de 12 días después de la infección (Van Maanen et al., 2000), los títulos de la Fijación del Complemento, post infección por VHE-1, pueden ser detectados alrededor de 10 días después de la exposición, alcanzando un pico de títulos a las 2-3 semanas (Mumford et al., 1987; Van Maanen et al., 2000).

2.4.4 Aborto

La infección por VHE-1 en yeguas preñadas puede resultar en abortos, dependiendo en cierta medida de la etapa de gestación. Como se ha explicado previamente, al menos tres distintos tipos celulares (epitelio, leucocitos y endotelio) en tres sistemas orgánicos separados (tracto respiratorio, sistema inmune y útero preñado) deben ser infectados secuencialmente con VHE-1 para poder originar un aborto (Allen et al., 1999). Clínicamente no existen signos evidentes que puedan predecir abortos, aunque estos se puedan dar desde dos semanas hasta varios meses después de iniciada la infección, de manera rápida y sin significar peligro para la yegua. Los abortos pueden ser una secuela de una infección respiratoria subclínica y una subsecuente viremia en yeguas preñadas. Sin embargo, hay también fuertes indicios que infecciones abortivas pueden surgir endógenamente como resultado de la reactivación del virus latente (Van Maanen et al., 2000). En yeguas en el último tercio de gestación, todo tipo de estrés (como transporte prolongado) puede incrementar el riesgo de infección del feto. De esta forma es que normalmente entre los 8 a 9 meses de gestación se dan la mayoría de casos de abortos; sin embargo pueden aparecer tan tempranamente como a los 4 meses. Después de la infección respiratoria exógena, el periodo entre infección y aborto puede variar entre 9 días a 4 meses (Mumford et al., 1987; Van Maanen et al., 2000).

De acuerdo a la infección experimental de VHE-1, no todos los fetos abortados han sido virológicamente positivos o mostrado lesiones histopatológicas específicas de herpesvirus, a pesar de no haber otro motivo demostrable para el aborto (Smith et al., 1992; Walker et al., 1999). Según Walker et al. (1999) pueden haber anormalidades en una placenta negativa a herpesvirus, a lo que sugirió que en infecciones por VHE-1 en gestación tardía, el aborto es por causas netamente de la madre, sin infección del feto. Por

ello después de un resultado negativo a los métodos de diagnóstico para la rinoneumonitis equina, la posibilidad del aborto por VHE-1 no puede ser excluida del todo. Especialmente en abortos tempranos (9 – 14 días después de la infección con VHE-1) se pueden encontrar fetos virológicamente negativos (Smith et al., 1992; Van Maanen et al., 2000). Frey y Lieb (1990) proponen que la causa de los abortos en estos casos es la replicación extensiva de VHE-1 en las células endoteliales del endometrio, lo que resulta en un daño severo del endometrio. Es de este modo que también ha sido demostrado el rol fundamental de la infección de células endoteliales en la patogénesis del aborto y síntomas neurológicos (Edington et al., 1991; Van Maanen et al., 2000).

El endometrio se vuelve más susceptible al daño viral en el último tercio de preñez, lo que explicaría la gran variación en periodos de incubación de abortos (Mumford et al., 1987; Allen et al., 1999). Es así que se detectó que la infección de las células endoteliales en un útero preñado a los 6 días PI intranasal con una cepa Ab4 se disemina alrededor de los días 9-13 PI, cuando es asociada a una severa necrosis trombo-isquémica que resulta en el aborto de un feto virológicamente negativo antes que la transferencia uteroplacentaria pueda ser detectada (Smith et al., 1992; Allen et al., 1999). Por ello que el aborto en yeguas infectadas por cepas altamente epiteliotrópicas de VHE-1 se aprecia como consecuencia del daño de un órgano tan vital en el mantenimiento fisiológico de la preñez (el útero), donde la infección del feto no es un pre-requisito vital para su suceso.

Sin embargo, estudios histológicos en úteros preñados con fetos infectados por VHE-1 demostraron que entre los 14-21 días PI hay presencia de trombosis endometrial e infartos locales en vez de difusos, con expresión de antígeno viral en células trofoblásticas ocasionales y vasos sanguíneos coriónicos de la placenta cubriendo el infarto endometrial (Smith et al., 1993, 1997; Allen et al., 1999). En la placenta los trofoblastos son los encargados de formar la interfase entre tejidos maternos y fetales, por lo que la infección de los trofoblastos sería particularmente eficiente en términos de introducir el virus en la circulación fetal, dándose así la transmisión transplacentaria de VHE-1 (Kimura et al., 2004). Concluyéndose que la infección placentaria permite posteriormente la infección del feto vía hematogena por los vasos sanguíneos del alantocórion y cordón umbilical, con una

extensión a las células endoteliales en las vísceras llevando esto a lesiones necróticas multi-orgánicas, resultando en abortos de fetos positivos a VHE-1 (Edington et al., 1991; Smith et al., 1993; Allen et al., 1999).

De acuerdo a varios estudios Smith et al. (1993) propuso un modelo (Fig. 3) que intenta predecir los caminos de la infección por el VHE-1 (Allen et al., 1999). Este modelo predice que una vez dada la infección con una cepa endoteliotrópica como la Ab4 (o Army 183) será el grado de trombosis desarrollado en el útero infectado el que determine el resultado de la preñez. Una trombosis diseminada y severa puede causar una isquemia y separación placentaria con consecuente expulsión de un feto fresco virológicamente negativo. Una trombosis menos severa puede permitir la infiltración de virus a través de la

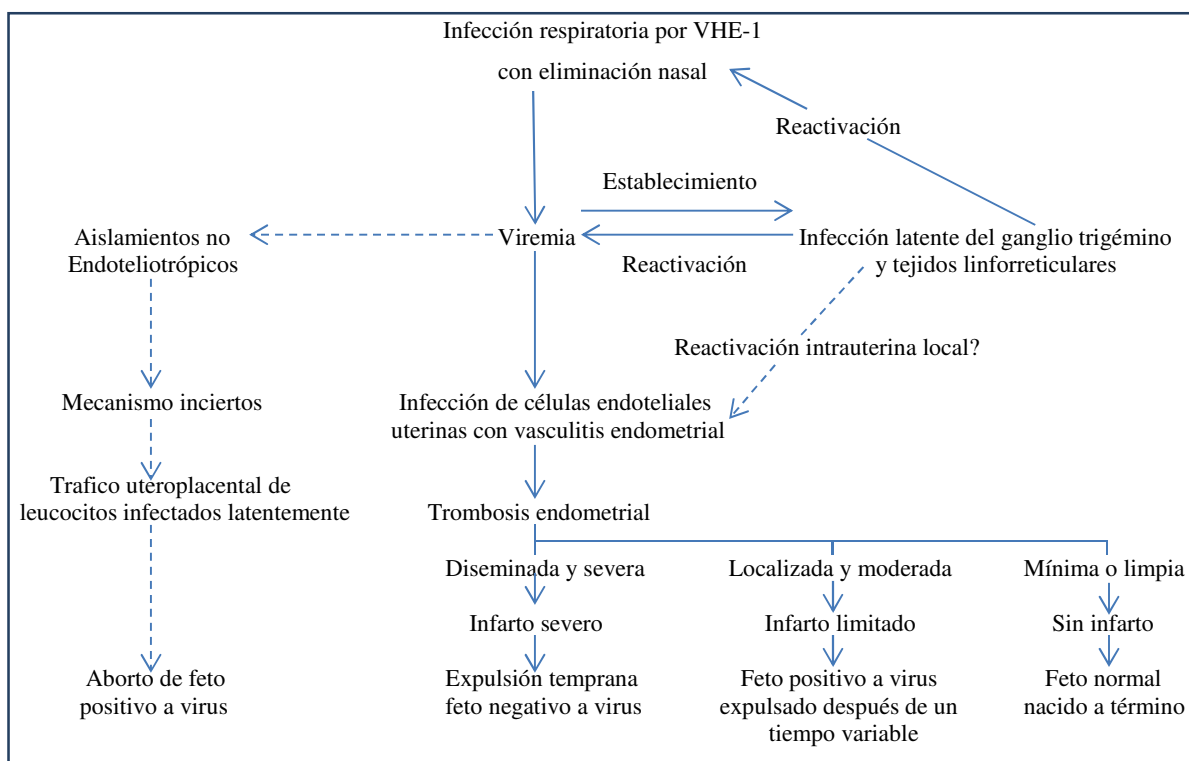


Fig. 3. Diagrama de representación de la patogénesis del VHE-1, cepa Ab4, en yeguas preñadas, explicando en términos generales los mecanismos responsables propuestos para el desenlace eventual de la preñez. Adaptado de Smith et al. (1993) Equine Veterinary Journal (Allen et al., 1999)

---> indican rutas especulativas

placenta en sitios de infartos microcotiledonarios, haciendo más progresivo el compromiso vascular y permitiendo una replicación viral en el feto previo al aborto de un feto virológicamente positivo. Una tercera posibilidad es que la formación de trombos en el endometrio sea mínima, sin que haya infartos y se obtenga un neonato sano a término (Smith et al., 1993; Szeredi et al., 2003). Estudios soportan la hipótesis de que el virus podría alcanzar la placenta mediante la difusión directa célula a célula desde las células epiteliales del endometrio a los trofoblastos (Mukaiya et al., 2000; Szeredi et al., 2003).

Así mismo, en hembras que abortan fetos infectados por VHE-1 se han encontrado concentraciones bajas de progesterona en plasma. Lo que podría ser causado por una patología placentaria inducida por virus (Allen et al., 1999). Esto tiene sentido, ya que la placenta es el productor principal de progesterona en el último tercio de gestación y cualquier alteración de la función placentaria podría causar, asociada con compromiso vascular uterino, el inicio de una parición prematura (Allen et al., 1999).

Los factores que incrementarían la susceptibilidad uterina ante una infección por VHE-1 en una gestación tardía son:

- Inmunosupresión local. Por liberación de progesterona en la interfase uteroplacental en la preñez intermedia y tardía (Asbury y LeBlanc, 1993; Allen et al., 1999).
- Desarrollo de microcotiledones complejos e individualmente vascularizados, por el día 150 de preñez, actuando cada uno como una terminación vascular y siendo susceptible a que ocurra (en cada uno) un infarto trombótico para el resto de la preñez (Allen et al., 1999).
- El desarrollo de un cuerpo lúteo secundario y la circulación de la gonadotropina coriónica equina (GCe o eCG, acrónimo del inglés equine chorionic gonadotrophin), entre los días 40 y 140 de preñez, pasando la preñez resistente a los efectos de prostaglandinas en una preñez inicial o intermedia (Allen y Stewart, 1993; Allen et al., 1999).

- Un incremento gradual de los niveles plasmáticos de fibrinógeno precoagulante, factor VIII:C y factor Von Willebrand de la preñez intermedia al parto (Gentry et al., 1992; Allen et al., 1999).

2.4.5 Enfermedad neonatal

Las infecciones neonatales por VHE-1 son usualmente fatales, con muerte eventualmente atribuida a los efectos secundarios de la viremia, como necrosis de tejidos linfoides, inmunosupresión, infecciones bacterianas secundarias y trastornos metabólicos (Perkins et al., 1999). Sin embargo en la actualidad las mejoras en los protocolos de cuidado de los neonatos han incrementado las probabilidades de que sobrevivan por mayores periodos de tiempo antes de que sucumban a los efectos secundarios de la viremia antes mencionados. Si el feto es infectado con VHE-1 tarde en la preñez, puede nacer muerto o vivo, pero débil, deprimido, polipneico y febril, y morir dentro de horas o días (Hartley y Dixon, 1979; Walker et al., 1999). Así mismo otros signos a mostrar por las crías infectadas *in utero* son ictericia, dificultad respiratoria y ocasionalmente problemas nerviosos. Otros potrillos pueden estar sanos al nacimiento pero sucumbir a los efectos del daño tisular inducido por el VHE-1 dentro de la primera semana de edad (Walker et al., 1999). En crías mayores un signo común es la descarga nasal.

2.4.6 Enfermedad neurológica

Entre los signos propios de la infección por una cepa neurológica están la ataxia, paresia o parálisis de los miembros posteriores y ocasionalmente de los miembros anteriores, retención urinaria y, en cuadros severos, postración. Estos casos pueden manifestarse previamente con signos respiratorios y han sido descritos principalmente en animales adultos. Los signos neurológicos son consecuencias tanto de la infección directa por VHE-1 como de los cambios vasculares en los tejidos nerviosos centrales también (Jackson et al., 1997; Walker et al. 1999). Estudios recientes han confirmado que la incidencia de enfermedad neurológica está ligada tanto a la magnitud como a la duración de la viremia asociada a células (Allen et al., 2008; Soboll et al., 2010).

Si bien es cierto, casi la totalidad de cepas de VHE-1 puede ocasionar abortos, solo ciertas cepas tienen el potencial para causar enfermedad neurológica. Esto se puede explicar en que dentro del ORF30 (un marco de lectura abierta –del inglés Opening Reading Frame- encargado de codificar ADN polimerasa viral) se da la sustitución del nucleótido adenina por guanina en la posición 2254 (ORF30; A₂₂₅₄ → G₂₂₅₄), lo que a su vez resulta en la sustitución del aminoácido asparagina (N) por ácido aspártico (D) en la posición 752 (N₇₅₂ → D₇₅₂) (Nugent et al., 2006; Smith et al., 2010). Según estudios de Allen y Timoney (2007) este genotipo fue identificado como el agente causal de 30 de 32 brotes de enfermedad neurológica por VHE-1, entre el 2001 y 2006, en Reino Unido y Estados Unidos. Las cepas neuropatogénicas de VHE-1 también son capaces de replicarse más eficientemente y llegar a niveles 10 veces más altos de viremia asociada a leucocitos que la observada en caballos infectados con cepas no neuropatogénicas de VHE-1 (Van de Walle et al., 2009; Smith et al., 2010).

2.4.6.1 Latencia

Una vez que la infección de fase virémica ha terminado, el VHE-1 persiste en estado latente en el sistema linforeticular, tanto en los linfocitos circulantes como en los nódulos linfáticos. (Chesters et al., 1997; Allen et al., 1999). La latencia, característica propia de la familia Herpesviridae, consiste en los mecanismo mediante los cuales el virus puede permanecer inactivo dentro de algunos grupos celulares, evitando así el ataque del sistema inmune y pudiendo reactivarse ante situaciones de gran estrés sin precisar de una nueva infección por VHE externos.

Como en otras infecciones por herpesvirus, ocurre la latencia del virus de por vida en el sistema nervioso del hospedero y la reactivación periódica de esta puede generar nuevos brotes (Slater et al., 1994b; Kondo et al., 2004). Los alfaherpesvirus generalmente producen latencia en neuronas sensitivas, siendo las neuronas del Ganglio Trigémico el sitio predominante de latencia (De Regge et al., 2010), como en el caso de los VHE-1 y VHE-4. Esta reactivación se puede dar de tiempo en tiempo, especialmente después de periodos de estrés severo, como el destete, castración, transporte prolongado o leve trauma nasal (Van Maanen, 2002). Experimentalmente se ha logrado reactivar el VHE-1 mediante

el tratamiento de caballos con corticosteroides (Slater et al., 1994a,b; Allen et al., 1999). Se debe tener en cuenta que el virus es siempre contagioso en este tiempo.

En el estado de latencia el VHE-1 es protegido de las acciones antivirales de los anticuerpos neutralizantes y los LTC. Es más, durante la infección de los linfocitos sanguíneos (alrededor del día 21 PI), hay una replicación restringida de VHE-1 seguida por la transición en latencia, durante la cual no se puede detectar la replicación viral y el genoma del VHE-1 existe como ADN latente con limitada actividad transcripcional (Chesters et al., 1997; Allen et al., 1999). De esta forma, el virus llegaría a las neuronas del nervio trigémino que inervan la mucosa nasofaríngea y conjuntiva, llegando al ganglio trigémino (Slater et al., 1994a,b; Allen et al., 1999). Siendo que la latencia se establecería en los linfocitos T (Chesters et al., 1997; Allen et al., 1999), expresándose el antígeno viral en la superficie tanto de linfocitos CD8⁺ y monocitos, como de algunos pocos linfocitos CD4⁺ en la fase aguda de la viremia (Slater et al., 1994a; Allen et al., 1999).

Mediante el uso de las técnicas de la técnica PCR y co-cultivación se demostró la persistencia del genoma del VHE-1 en leucocitos del sistema linforeticular y neuronas sensoriales del ganglio trigémino (Allen et al., 1999). Esto gracias a que el co-cultivo prolongado induce la reactivación *in vitro* del virus latente a una forma infecciosa, detectándose el ADN oculto del VHE-1 en células infectadas latentemente (Welch et al., 1992; Allen et al., 1999).

2.5 DIAGNÓSTICO

De acuerdo a lo expuesto previamente, a la potencial morbilidad y mortalidad que tiene la infección causada por VHE-1/VHE-4, se hacen necesarios métodos de diagnósticos rápidos y precisos para la toma de acciones y medidas de control, así como preventivas en los lugares donde la infección aún no haya llegado. Es así que en las últimas décadas se han generado diversas metodologías de diagnóstico entre las que podemos mencionar el PCR, los ELISA, ensayos de tinción inmunohistoquímica con peroxidasa o las pruebas de hibridación de ácido nucleico. Sin embargo según la OIE (2012) a pesar de ser, las previamente mencionadas, técnicas rápidas de diagnóstico, su uso esta comúnmente

restringido a estudios de laboratorios especializados de referencia. Siendo los métodos tradicionales como el aislamiento en cultivo celular y la posterior seroidentificación de virus aislados, los de primera elección. El éxito en el diagnóstico de VHE-1 y VHE-4 dependerá de la adecuada toma de muestra y posterior procesamiento de laboratorio.

2.5.1 Aislamiento Viral

Como se expuso anteriormente, este es el método estándar de identificación de los VHE-1/VHE-4, siguiéndole posteriormente la serología. Para un aislamiento primario eficiente de VHE-4 de caballos con enfermedad respiratoria, debe de usarse cultivos celulares derivados de equinos (debido a su mayor sensibilidad). Tanto el VHE-1 y VHE-4 pueden ser aislados de muestras nasofaríngeas usando células primarias de riñón fetal equino o células de fibroblastos equino derivados de tejido dermal o pulmonar. El VHE-1 puede ser aislado en otros tipos celulares también, como es el caso en aislamientos de tejidos de fetos abortados o de tejidos post-mortem en casos de enfermedad neurológica (donde se suele usar tipos celulares como: rabbitkidney [RK-13], babyhamsterkidney [BHK-21], Madin–Darbybovinekidney [MDBK], pigkidney [PK-15], etc.) (OIE, 2012).

2.5.2 Detección del Antígeno Viral

2.5.2.1 Inmunofluorescencia directa

Utilizado como método específico para la identificación de antígeno viral de un aislamiento como VHE-1 o VHE-4, en cultivo celular infectado, usando anticuerpos monoclonales (mAb) que esta disponibles en laboratorios de referencia (OIE, 2012). La inmunofluorescencia directa de tejidos de fetos obtenidos en necropsia ha demostrado tener el mismo grado de confiabilidad que la técnica de aislamiento viral.

2.5.2.2 Tinción con Inmuperoxidasa

Procedimiento para la detección de antígeno de VHE-1 mediante la inclusión en parafina de tejidos de fetos equinos abortados o de caballos afectados neurológicamente, aunque también puede ser trabajado en monocapas celulares infectadas por VHE-1 o VHE-4. Es un método auxiliar de Inmunohistoquímica para trabajar con muestras de tejidos archivadas o en casos clínicos donde no haya habido resultados con métodos de diagnóstico

tradicionales. Es usada también para la evaluación de lesiones morfológicas y la identificación del agente. Se debe tener en cuenta el uso de controles tanto para la evaluación de la especificidad del método y de los anticuerpos. En estudios realizados por Perkins et al. (1999) evidenciaron antígenos positivos a la tinción por inmunoperoxidasa en al menos un tipo de los órganos hemolinfáticos (nódulos linfáticos, bazo o timo) en cada potrillo del estudio (14 animales positivos a VHE-1).

2.5.2.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Utilizada para la amplificación rápida y detección diagnóstica de ácidos nucleicos de casos clínicos de VHE-1 y VHE-4, de tejidos archivados embebidos en parafina o cultivos celulares inoculados. Con este método y gracias a una variedad de primers (cebadores) específicos de tipo, se puede realizar un diagnóstico diferenciado entre VHE-1 y VHE-4 con una correlación alta con la técnica de aislamiento viral, aún sin la presencia de virus infectante en la muestra. Este método resulta más confiable con muestras de fetos abortados o frotis nasofaríngeos y leucocitos de sangre periférica de potrillos y animales de un año, para diagnóstico de infección activa. Para diagnóstico de casos neurológicos, es mejor la examinación del tejido de la médula espinal y cerebro, así como células mononucleares de sangre periférica (OIE, 2012). Según Carvalho et al. (2000) el PCR ha demostrado ser más sensitivo que la técnica de aislamiento viral para detectar virus en el semen de los caballos.

Los ensayos de PCR cuantitativos (conocido como PCR en tiempo real) no solo detectan la secuencia de los patógenos de interés, sino que proveen una medición aguda de la cantidad de patógeno presente en la muestra. Aun así, como toda técnica diagnóstica auxiliar, los resultados del PCR deben ser analizados según el contexto de cada caso clínico, teniendo en cuenta la presencia de múltiples agentes infecciosos, no solo los virus, que tienen posibilidad de estar presentes en los tejidos de toma de muestra. Por ello, si uno fuera a sospechar de VHE en un caso de enfermedad respiratoria, la posibilidad de que un resultado positivo por PCR se deba a la reactivación y excreción nasal de VHE latente que haya sido provocado por una condición primaria sin relación podría ser considerada. No sin antes evaluar la presencia de otros agentes (o condiciones subyacentes), previo al

diagnóstico (Cathcart y Murcia, 2012). Así también pues el PCR en tiempo real es una técnica menos cara y está sujeta a automatización, permitiendo un mayor rendimiento y menor tiempo de entrega de resultados, ya que el uso de sondas fluorescentes específicas de diana incrementa la sensibilidad y especificidad de la prueba. Debido a ello que el PCR en tiempo real sea una poderosa herramienta para futuras investigaciones de la patogénesis del VHE-1 y VHE-4 y el desarrollo de vacunas, al poder evaluar la carga viral y diseminación viral en potrillos seronegativos vacunados y no vacunados luego de desafío viral (Elia et al., 2006).

2.5.2.4 Histopatología

Se realiza tanto en secciones de muestras fijadas con formalina o tejidos embebidos en parafina (ya sea de fetos abortados o de caballos afectados neurológicamente). En muestras de fetos abortados se puede observar lesiones patognomónicas como los cuerpos de inclusión intranuclear típicos dentro del epitelio bronquiolar o en células periféricas de áreas de necrosis hepática. En casos neurológicos de VHE-1 las lesiones microscópicas a buscar (no patognomónicas) son la vasculitis trombótica degenerativa de pequeños vasos sanguíneos en el cerebro o médula espinal (manguitos perivasculares e infiltración de células inflamatorias, proliferación endotelial y necrosis, y formación de trombos).

2.5.3 Detección de Anticuerpos

2.5.3.1 Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima (ELISA)

Es una técnica comúnmente utilizada hoy en día para el diagnóstico de VHE-1 y VHE-4. Siendo considerada de mayor sensibilidad que las pruebas de Neutralización Viral, aunque menor que la prueba de PCR. El desarrollo de ELISAs específicos de tipo, que detecte anticuerpos a epítipo específico tipo inmunodominante de gG ha permitido el serodiagnóstico específico de infecciones entre VHE-1 y VHE-4 (Crabb y Studdert, 1993; Crabb et al., 1995; Yasunaga et al., 1998; Van Maanen, 2002). También se han desarrollado ELISA de bloqueo para el diagnóstico de esta infección, los cuales son fáciles de utilizar, económicos en el uso de reactivos y no necesitan de ambas cepas (VHE-1 y VHE-4) para el diagnóstico serológico de VHE-1 o VHE-4 (Van Maanen et al., 2000; Van Maanen, 2002).

2.5.3.2 Neutralización Viral

El rol de los anticuerpos neutralizantes podría depender de la cantidad presente en la sangre circulante (Van Der Meulen et al, 2000; Soboll et al., 2006). Así mismo, esta técnica es extensamente utilizada a nivel mundial y recomendada por la OIE para el diagnóstico de la RNE por su alta especificidad (Ríos et al., 2002). La prueba se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos neutralizantes para bloquear el efecto citopático del virus en la célula indicadora donde se añade e incuba como indicador celular. De esta manera esta técnica da resultados tanto cualitativos (de ausencia o presencia de los anticuerpos contra la enfermedad) como cuantitativos (previas diluciones de las muestras de suero).

2.6 EPIDEMIOLOGÍA

2.6.1 Prevalencia

La RNE es una enfermedad muy diseminada a los largo de todo el mundo. Y dentro de sus agentes el VHE-4 es el más prevalente (Edington et al., 1994; Gilkerson et al., 1999b; Soboll et al., 2006), aunque el VHE-1 es la mayor causa de enfermedad más severa (Soboll et al., 2006). La alta prevalencia de estos dos agentes resulta de la alta tasa de infecciones respiratorias iniciales en caballos jóvenes, el establecimiento de latencia en linfocitos y tejido neuronal, y los frecuentes episodios de reactivación en donde los portadores silenciosos diseminan el virus a nuevos hospedadores (Allen et al., 1999; Soboll et al., 2006). El VHE-4, aparentemente solo causa abortos o enfermedad neurológica de modo accidental y se le considera menos relevante a VHE-1 con respecto a estas secuelas. Siendo considerado relevante en la enfermedad del tracto respiratorio superior de potrillos y animales de un año de edad (Van Maanen et al., 2001; Van Maanen, 2002).

En muchos países la seroprevalencia de VHE-1 y VHE-4 es muy alta. Sin embargo, muchas pruebas serológicas no pueden diferenciar entre anticuerpo a VHE-1 y VHE-4 debido a la reactividad cruzada antigénica extensiva que hay entre ambos virus. Crabb y Studdert (1993) fueron los primeros en demostrar mediante el uso de pruebas serológicas específicas de tipo, que en pruebas al azar de caballos de carrera todos los caballos fueron positivos para VHE-4, mientras solos 9% fue positivo a VHE-1. Así mismo en un posterior

estudio Crabb et al. (1995), encontró que la seroprevalencia para anticuerpos específicos de VHE-1 aumento a un 30% mientras que la seroprevalencia de anticuerpos específicos a VHE-4 fue de nuevo de 100% (Van Maanen, 2002).

El VHE-4 se considera enzoótico en muchas poblaciones del mundo, principalmente en Estados Unidos, Japón y Australia (Matsumura et al., 1992; Gilkerson et al., 1999a,b; Ruíz-Sáenz et al., 2008). De igual forma la infección por VHE-1 ha sido descrita en los países anteriormente mencionados y en países Latinoamericanos como Brasil (Cunha et al., 2002), Argentina (Galosi et al., 1998), Chile (Berrios, 2002), Colombia (Ruíz-Sáenz et al., 2008). En el Perú Ríos et al. (2002) demostró la presencia de Rinoneumonitis equina en caballos del Valle de Lima.

Hay una mayor incidencia de enfermedad neurológica por VHE-1 entre el final del invierno, primavera e inicios del verano, posiblemente como reflejo de la ocurrencia contemporánea de casos de aborto por VHE-1 en los mismos meses (Wilson, 1997; Van Maanen, 2002). En la última década (desde el 2000) ha incrementado la aparición de casos neurológicos de manera significativa. Dentro de los Estados Unidos y Reino Unido, los reportes de brotes neurológicos han incrementado de una ocurrencia a inicios de los 70's a 32 durante los años 2001-2005 (Anonymous, 2007; Smith et al., 2010). En el 2005 hubieron brotes de enfermedad neurológica en Canadá, Sudáfrica, Suiza, Irlanda y otras naciones europeas (Goehring et al., 2006; Slater et al., 2006; Smith et al., 2010)

2.7 CONTROL Y PREVENCIÓN

El buen manejo de los reproductores, higienización en las actividades reproductivas y de crianza, en conjunto con la vacunación, son la clave para la prevención de infecciones por VHE. Teniendo en cuenta que el control de infecciones por VHE-1, por ejemplo, son obstaculizados por la latencia y posterior reactivación de infecciones previas, incluso ante la presencia de anticuerpos específicos contra la enfermedad (Elia et al., 2006). Otro punto a tomar en cuenta es la notificación de los casos, motivo por el cual la empresa Merial lanzó en Estados Unidos el 2011 un programa libre “www.outbreak-alert.com” cuya finalidad es la notificar a los propietarios y veterinarios sobre reportes de enfermedades

equinas alrededor del país. Siendo en ellos de gran importancia la notificación de casos de rinoneumonitis, por la gran frecuencia de casos y en especial énfasis por aquellos con manifestaciones nerviosas que han sucedido en los últimos años. En otros países como Irlanda no hay requerimientos de notificación legal de la enfermedad, pero se recomienda el informar a las asociaciones de criadores si esta ocurre. En el Perú debido a que no existe un conocimiento real de la situación de esta enfermedad, tampoco se manejan sistemas de notificación o monitoreo. Aun así, es importante alertar a los propietarios de equinos que podrían estar en riesgo de contacto con un caballo enfermo o predios contaminados luego de confirmarse un brote, debido a la alta morbilidad de la infección.

Desde que todos los caballos (incluido los potrillos y potrancas) y también los ponis pueden ser fuente de infección de VHE, el manejo de los reproductores debe ser óptimo a tal punto de lograr minimizar el riesgo de transmisión de la enfermedad entre los individuos, de aparecer ésta en el establo. Por ningún motivo ningún caballo sospechoso o con la certeza de estar infectado con VHE puede ser enviado a la caballeriza de los sementales, a otros lugares donde haya yeguas gestantes o reproductoras, y mucho menos a eventos públicos donde pueda estar en contacto con otros ejemplares. También tener en cuenta que todo aborto, mortinato, potrillo muerto o enfermo dentro de los primeros 14 días de nacido debe ser relacionado con una posible infección por VHE, debiéndose tomar las medidas correspondientes.

No se debe olvidar que tanto el VHE-1 como el VHE-4, tienen la capacidad de sobrevivir por muchas semanas luego de ser diseminados por un animal enfermo, motivo por el cual se debe tener mucha consideración y cuidado al momento de manejar animales sospechosos de infección. Esto con el fin de evitar actuar como agente diseminador de la misma al tratar después a animales sanos. Aun con todo esto, tales agentes virales son susceptibles a altas temperaturas y la acción de desinfectantes, por lo que una desinfección profunda y descanso del ambiente infectado son necesarios.

2.7.1 Vacunación

Las vacunas vivas atenuadas tanto como las inactivadas están disponibles y son comercializadas en la actualidad, como medio de prevención (de acuerdo a distintos estudios y a lo explicado previamente se sabe que no confieren una inmunidad de un 100% ni de larga duración) para la infección por VHE-1 y VHE-4, siendo solo cuatro vacunas las que han pasado los requerimientos necesarios para ser consideradas eficaces en el control de aborto por VHE, como resultado de vacunas exitosas y experimentos de desafío en yeguas preñadas (OIE, 2012). Ninguna de las vacunas ha probado hasta la actualidad tener efecto sobre el control de la enfermedad neurológica causada por algunas cepas de VHE-1. Se recomienda vacunar a las reproductoras con vacunas hechas para prevenir abortos y enfermedad respiratoria, aunque no proporcione un 100% de protección. La práctica sugiere que la vacunación durante el periodo de incubación puede incrementar las opciones de parálisis.

Vacunas con virus muerto inducen típicamente solo respuestas de los anticuerpos circulantes, los que son ineficientes para controlar la infección (Bürki et al., 1990; Soboll et al., 2006). La explicación se da en que las proteínas contenidas en las vacunas inactivadas no se procesan normalmente mediante la ruta del CMH, la cual es necesaria para la inducción de LTC (Audibert y Lise, 1993; Soboll et al., 2006).

Las vacunas vivas modificadas son capaces de inducir tanto anticuerpos como la respuesta LTC (Ellis et al., 1995; Soboll et al., 2006), pero no se recomiendan para hembras gestantes, las cuales son las candidatas primordiales a vacunar (Oehen et al., 1991; Allen et al., 1999; Soboll et al., 2006).

Sigue siendo un desafío el conseguir mejores vacunas y con una efectividad que logre una inmunidad que tenga un efecto inmunitario más prolongado, tanto para proteger animales de las infecciones primarias de VHE-1 como de las infecciones reactivadas. Un logro ha sido las vacunas DNA con secuencias de codificación de glicoproteína debido a su potencial para inducir las inmunidades humores y mediadas por células (Fynan et al., 1993; Kondo et al., 2004). La inoculación intramuscular de los ratones con DNA de la

glicoproteína D (gD) ha mostrado protegerlos del desafío con virus silvestres e inducir niveles altos de anticuerpos específicos de gD en caballos con anticuerpos a VHE-1 y VHE-4 preexistentes (Ruitenbergh et al., 2000a; Kondo et al., 2004). Por otra parte, una estrategia de inmunización con estímulo primario de inoculación con DNA de gD seguido por una proteína gD purificada ha mostrado mejorar tanto la respuesta inmune humoral como la mediada por células. (Ruitenbergh et al., 2000b; Kondo et al., 2004).

Otra técnica prometedora es la inmunización en polvo epidermal (IPE). Reparte DNA o antígenos por un sistema directo de entrega, libre de aguja, a la epidermis en donde las células de Langerhans, con habilidades para procesar y presentar antígenos, son abundantes (Chen y Payne, 2002; Kondo et al., 2004). Por ello, debido a que ahora con el conocimiento de que la IPE induce respuestas de LTC y respuesta humoral, una vacunación de estímulo primario mediante el uso de vacuna inactivada intranasal (para la respuesta inmune por mucosas) junto a una IPE (para ambas respuestas, humoral y celular) podría ser más efectiva en prevenir infecciones por VHE-1 (Kondo et al., 2004) que solo el uso de un tipo de vacunas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS DE SUERO

Se utilizaron 825 muestras de suero de equinos de ambos sexos mayores a 6 meses de edad. Las muestras fueron obtenidas de caballos de los 24 departamentos y de la provincia constitucional del Callao del Perú por los profesionales del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) en el periodo 2011-2012. Para fines del estudio, los 24 departamentos fueron agrupados de modo arbitrario en zona ubicada al Nor-Este, Centro y Sur-Este del país, como se detalla en el cuadro 1, 2 y 3. Donde también se hace una clasificación de acuerdo al tipo de actividad.

Cuadro 1. Distribución por departamento y tipo de actividad de los caballos ubicados en la zona Nor-Este del país

Departamento	CTT	CPP	CC	CD	S/E	N° de animales
Amazonas	35	0	0	0	0	35
Cajamarca	105	20	0	0	5	130
La Libertad	13	22	0	5	0	40
Lambayeque	15	0	0	0	0	15
Loreto	3	2	0	0	0	5
Piura	68	7	0	5	0	80
San Martín	40	0	0	0	0	40
Tumbes	5	0	0	0	0	5
TOTAL	284	51	0	10	5	350

*CTT = caballo de trabajo o tiro; CPP = caballo de paso peruano; CC = caballo de carrera; CD = caballo deportivo; S/E = sin especificar

Cuadro 2. Distribución por departamento y tipo de actividad de los caballos ubicados en la zona Centro del país

Departamento	CTT	CPP	CC	CD	S/E	N° de animales
Ancash	40	0	0	0	0	40
Cerro de Pasco	15	0	0	0	0	15
Huancavelica	37	0	5	0	8	50
Huánuco	45	0	0	0	0	45
Junín	19	1	0	0	0	20
Lima-Callao	10	0	0	0	10	20
Madre de Dios	5	0	0	0	0	5
Ucayali	0	0	0	0	5	5
TOTAL	171	1	5	0	23	200

Cuadro 3. Distribución por departamento y tipo de actividad de los caballos ubicados en la zona Sur-Este del país

Departamento	CTT	CPP	CC	CD	S/E	N° de animales
Apurímac	75	0	0	0	0	75
Arequipa	15	0	0	0	0	15
Ayacucho	40	0	0	0	0	40
Cusco	75	10	0	0	0	85
Ica	5	5	0	0	0	10
Moquegua	5	0	0	0	0	5
Puno	35	0	0	5	0	40
Tacna	0	0	5	0	0	5
TOTAL	250	15	5	5	0	275

3.1.1 Tamaño de Muestra

El tamaño muestras fue obtenido mediante la fórmula para muestreo por conglomerado en dos etapas o también denominado “Muestreo en Multi-etapas” (Segura y Honhold, 2000). Un muestreo por conglomerados se obtiene midiendo algunos de sus elementos para obtener una muestra probabilística del conglomerado. Es por ello que el

tamaño de la muestra debe ser mayor, y se usa como regla práctica que el muestreo conglomerado debe incrementar el error estándar entre dos y cuatro veces, por lo que se necesita una muestra entre dos y cuatro veces más grande que el tamaño obtenido para el muestreo simple al azar.

Para determinar el número de conglomerados (predios) y tamaño de muestra a utilizar en un muestreo al azar en dos etapas se realizó lo siguiente:

Tamaño de muestra

Para un muestreo al azar en dos etapas, el tamaño de muestra fue el resultado de multiplicar el valor del Efecto de Diseño (D) por el tamaño de muestra para el muestreo simple al azar (n_{msa}). Es decir:

$$n = D * n_{msa}$$

dónde

$$n_{msa} = \frac{NZ^2pq}{Nd^2 + Z^2pq} \quad (\text{Para una población finita})$$

N = Tamaño total de la población (población de caballos 1062154. INEI, 1994).

d = Precisión deseada (para este estudio se usa 0.05).

Z = Valor crítico de la distribución del estadístico **Z** o valor de **t** de Student con un número infinito de grados de libertad (con una confianza del 95% el valor es de 1.96).

p = prevalencia esperada (0.44; prevalencia indicada por Ríos et al. 2002).

q = p - 1

$$n_{msa} = \frac{(1062154) (1.96)^2 (0.44) (0.56)}{(1062154)(0.05)^2 + (1.96)^2 (0.44) (0.56)} = 378.49 = 379 \text{ animales}$$

Dado que al inicio del estudio no se conocía el efecto de diseño, se consideró arbitrariamente el valor de 2 para este estudio.

De esto tenemos que el tamaño de muestra fue:

$$n = D * n_{msa} = (2) (379) = 758$$

Número de predios

$$m = \frac{n}{b}$$

dónde

m = número de predios a muestrear

n = número de animales a muestrear

b = número de animales a muestrear en cada predio. Para esta ocasión se escogió arbitrariamente el valor de 5, en búsqueda de un número de predios medio, según lo explicado por Segura y Honhold (2000).

Por lo tanto:

$$m = \frac{n}{b} = \frac{758}{5} = 151.6$$

Haciendo el redondeo tenemos 152 predios a evaluar, por lo que el total real de animales a muestrear es: $152 * 5 = 760$ animales.

Teniendo esto en cuenta y recurriendo a los datos ofrecidos por el INEI (1994) y de acuerdo a las proporciones de animales por departamento se realizó la distribución de predios a muestrear por departamento (Cuadro 4).

Al momento de revisar la distribución proporcional de predios de acuerdo a la proporción de estos por departamento, se tuvo la necesidad de redondear los resultados, pues no se pudo muestrear 0.51 predios, más si 1, por citar como ejemplo el departamento de Tumbes. Esto llevará al incremento del tamaño de predios hasta 165, por lo que el número de muestra total sube a 825. Lo cual no hace más que fortalecer la confianza del estudio.

Cuadro 4. Estadísticas para la distribución de predios y cantidad de animales a muestrear de acuerdo a la población real por departamentos según el INEI (1994)

Departamento	Ganado equino			Muestreo en dos etapas		
	Caballos y yeguas		Densidad de UA*	N° de UA	N° de UA (redondeo)	N° de animales
	Unidad Agropec.	N° de animales				
Ancash	19125	42818	5.25	7.98	8	40
Amazonas	15965	35277	4.38	6.66	7	35
Apurímac	34624	103091	9.50	14.44	15	75
Arequipa	6658	11659	1.83	2.78	3	15
Ayacucho	18303	45972	5.02	7.63	8	40
Cajamarca	60426	343707	16.58	25.20	26	130
Cerro de Pasco	5504	16523	1.51	2.30	3	15
Cusco	38948	108016	10.69	16.25	17	85
Huancavelica	22899	46760	6.28	9.55	10	50
Huánuco	19596	49002	5.38	8.17	9	45
Ica	2934	5613	0.81	1.22	2	10
Junín	9244	22035	2.54	3.86	4	20
La Libertad	18882	42794	5.18	7.88	8	40
Lambayeque	5330	11290	1.46	2.22	3	15
Lima-Callao	8162	18992	2.24	3.40	4	20
Loreto	814	1828	0.22	0.34	1	5
Madre de Dios	73	268	0.02	0.03	1	5
Moquegua	1017	1416	0.28	0.42	1	5
Piura	38046	79226	10.44	15.87	16	80
Puno	18156	35504	4.98	7.57	8	40
San Martín	17371	34385	4.77	7.25	8	40
Tacna	701	1190	0.19	0.29	1	5
Tumbes	1215	3322	0.33	0.51	1	5
Ucayali	420	1466	0.12	0.18	1	5
TOTAL	364413	1062154	100.00	152	165	825

*UA: Unidad agropecuaria (predios)

NOTA: Para la elección al azar de los predios y posteriormente de los animales dentro de estos, se usó el Programa Research Randomizer Form v4.0

3.2 MATERIALES

3.2.1 Reactivos y equipos

Se utilizaron el medio MEM (Minimun essential médium), Sigma caldo triptosa al 2.95%, antibióticos y antimicóticos (penicilina, estreptomicina, fungizona) y tripsina Versene obtenido en forma comercial (SIGMA, USA), centrifuga, baño maría (Precision Scientific, USA), cabina de flujo laminar tipo II (Steril Gardhood, USA), estufa 37 °C de CO₂ (Memmert, Alemania), vórtex y microscopio invertido (Leitz).

3.2.2 Células

Se utilizó células de cornete nasal de feto bovino como sistema indicador de acuerdo al protocolo desarrollado por la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM

3.2.3 Cepa Viral

La cepa vacunal Rhinomune HVE-1 (Herpes Virus Equino tipo-1), donado por el Dr. Robert Ellis (USA), fue utilizada como antígeno en la prueba de neutralización viral con un título de 100^{-5} DL₅₀ CC/50 µl.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos contra el virus se realizó según el protocolo disponible en la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la FMV-UNMSM, de acuerdo con lo estipulado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2012). Brevemente la prueba consistió:

- Las muestras de suero equino fueron inactivadas a una temperatura de 56 °C en el baño maría por 30 minutos.

- Se distribuyó 50 µl del medio diluyente (MEM más antibiótico), libre de suero bovino, en todos los pozos de las placas con excepción de las 4 últimas columnas de la última placa.
- Se colocaron 50 µl de cada suero problema en los pozos de la fila H.
- Se hicieron diluciones dobles de cada suero, comenzando con la dilución 1:2 (fila H), 1:4 (fila G), así sucesivamente hasta 1:256 (fila A).
- Se añadieron 50 µl del virus conteniendo las 100DI₅₀ CC/50 µl a todas los pozos con las diluciones de los sueros problemas.
- Se añadieron los controles de virus en concentraciones de 100 DI₅₀ CC/50 µl y 10DI₅₀ CC/50 µl, 1 DI₅₀ CC/50 µl y 0.1 DI₅₀ CC/50 µl, en los hoyos de la “fila H” a la “fila E” y en las 4 restantes se colocaron los controles de las células.
- Se incubaron las placas a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora.
- Se añadieron 100 µl de suspensión de células en una concentración de 3x10⁵ células /ml a toda la microplaca y se incubaron a 37 °C y en una atmosfera de 5 % de CO₂ por 3 días.

Lectura

Una muestra de suero fue considerada positiva a anticuerpos cuando fue capaz de neutralizar la capacidad infectante del virus en la monocapa celular hasta 100% y una muestra fue considerada negativa a anticuerpos cuando se observó 100% de efecto citopático en la monocapa celular.

3.3.2 Análisis de Datos

Se determinó la prevalencia de la Rinoneumonitis Equina, mediante la siguiente fórmula (Segura y Honhold, 2000):

$$\bar{p} = \frac{\sum \alpha_i}{\sum n_i}$$

dónde:

\bar{p} = prevalencia

a_i = total de casos en los conglomerados seleccionados

n_i = unidades de muestreo medidas en los conglomerados seleccionados

La prevalencia determinada se expresa con un intervalo de confianza (IC) del 95% según la siguiente fórmula (Daniel, 1994):

$$IC = Z \sqrt{(pq/n)}$$

dónde:

p = prevalencia encontrada

$q = 1 - p$

Z = Valor crítico de la tabla de T de Student, con infinito número de grados de libertad para un nivel de confianza del 95%

n = tamaño muestral

Dentro de los análisis realizados, se efectuó la Regresión Logística en busca de predecir la asociación de la variable dependiente “Estatus sanitario” (variable dicotómica: negativo o positivo a anticuerpos contra VHE-1/VHE-4) con las variables independientes “Sexo” (macho o hembra), “Lugar” (región nor-este, centro o sur-este) y “Tipo de actividad” (caballo de trabajo o tiro, caballo peruano de paso, caballo de carrera, caballo deportivo o sin especificar). Para esto se utilizó el Programa Estadístico y Análisis de Datos STATA v12.0.

Al evaluar las variables independientes con más de dos categorías como “Lugar” y “Tipo de actividad” se compararon el efecto y riesgo de sus categorías contra la primera de ellas, sobre la variable dependiente “Estatus”. Para ser más precisos, sobre las categorías nor-este para “Lugar” y caballo de trabajo y tiro para “Actividad”.

IV. RESULTADOS

La seroprevalencia del VHE-1/VHE-4 detectada en las muestras de caballos a nivel nacional fue $48.9 \pm 3.4\%$ (403/825). Los anticuerpos fueron detectados en las muestras de caballos de todos los departamentos dedicados a distintas actividades con excepción de las muestras obtenidas de caballos en Madre de Dios. La seroprevalencia promedio del VHE-1/VHE-4 en los caballos de los departamentos ubicados en el Nor-Este fue de $42.6 \pm 5.2\%$ (149/350) (Cuadro 5), en los caballos de los departamentos ubicados al Centro $71.0 \pm 6.3\%$ (142/200) (Cuadro 6) y en los caballos de los departamentos ubicados en el Sur-Este $40.7 \pm 5.8\%$ (112/275) (Cuadro 7). En la Grafica 1, se presenta la seroprevalencia de VHE-1/VHE-4 por departamentos.

Los títulos de anticuerpos tuvieron un rango entre 1:2 a >1:256, siendo los de 1:2 a 1: 8 los más frecuentes, el 11.9% tuvieron títulos entre 1: 128 a > a 1: 256 (Cuadro A1). Los títulos de anticuerpos detectados en los caballos según sexo se presentan en el cuadro 8. Siendo que los machos presentaron una prevalencia promedio del VHE-1/VHE-4 de $49.7 \pm 4.6 \%$ (224/451) y la hembras de $47.9 \pm 5.1\%$ (179/374). Mientras los títulos de anticuerpos según tipo de actividad se presentan en el cuadro 9, observándose que la mayor prevalencia la tuvieron los caballos de carrera, la cual fue de 90.0% (9/10). En el cuadro 10 se detalla los títulos de anticuerpos de acuerdo al rango de estos y al tipo de actividad de los caballos.

Cuadro 5. Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos de los departamentos de la región Nor-Este del Perú

Departamento de procedencia	N° de animales	Positivos a anticuerpo contra VHE-1/VHE-4	
		n°	%
Amazonas	35	18	51.4
Cajamarca	130	53	40.8
La Libertad	40	32	80.0
Lambayeque	15	5	33.3
Loreto	5	1	20.0
Piura	80	30	37.5
San Martín	40	8	20.0
Tumbes	5	2	40.0
TOTAL	350	149	42.6

Cuadro 6. Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos de los departamentos de la región Centro del Perú

Departamento de procedencia	N° de animales	Positivos a anticuerpo contra VHE-1/VHE-4	
		n°	%
Ancash	40	30	75.0
Cerro de Pasco	15	10	66.7
Huancavelica	50	38	76.0
Huánuco	45	26	57.8
Junín	20	19	95.0
Lima-Callao	20	17	85.0
Madre de Dios	5	0	0.0
Ucayali	5	2	40.0
TOTAL	200	142	71.0

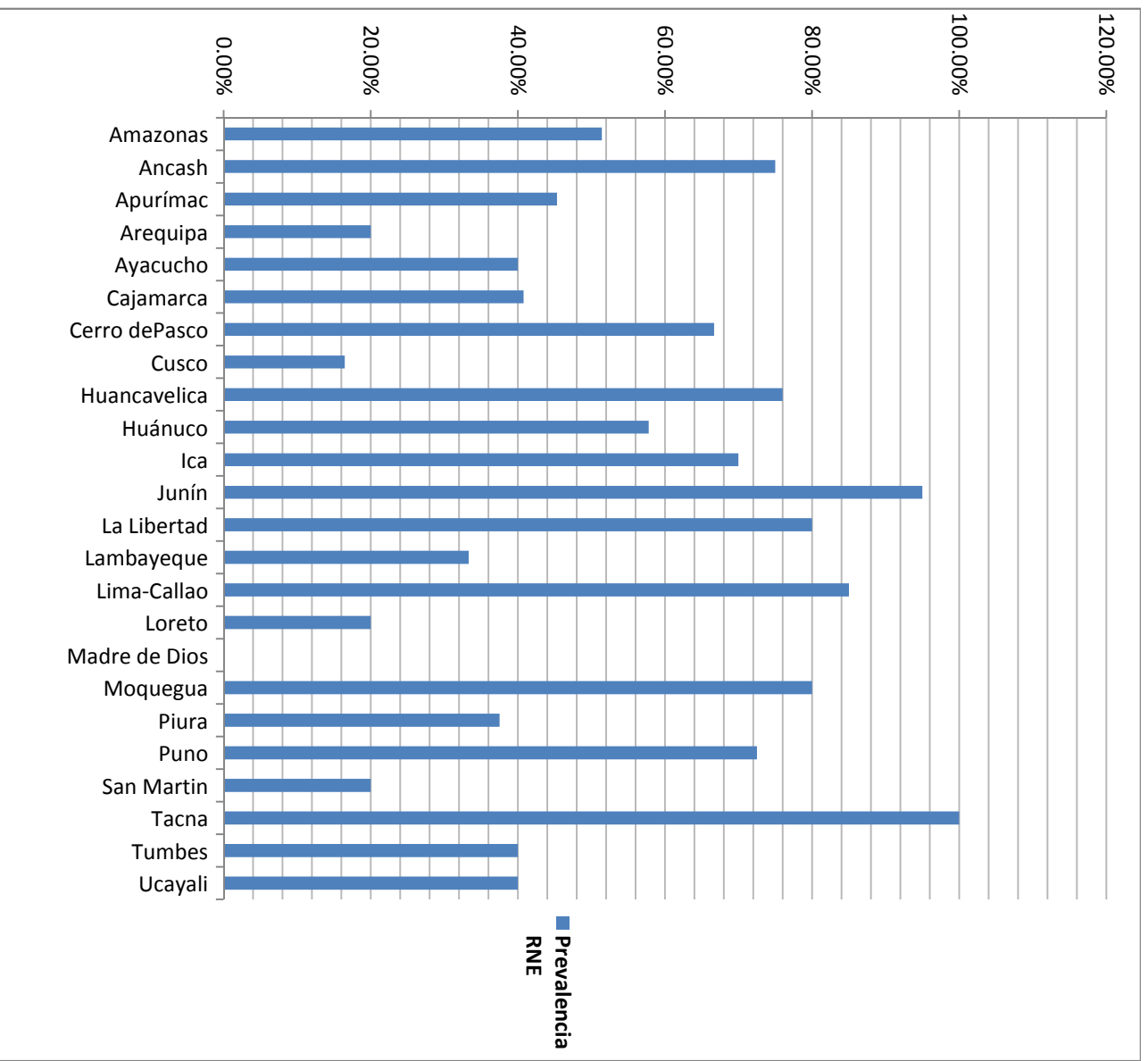
Cuadro 7. Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos de los departamentos de la región Sur-Este del Perú

Departamento de procedencia	N° de animales	Positivos a Anticuerpo contra VHE-1/VHE-4	
		n°	%
Apurímac	75	34	45.3
Arequipa	15	3	20.0
Ayacucho	40	16	40.0
Cusco	85	14	16.5
Ica	10	7	70.0
Moquegua	5	4	80.0
Puno	40	29	72.5
Tacna	5	5	100.0
TOTAL	275	112	40.7

Cuadro 8. Seroprevalencia de la Rinoneumonitis Equina en caballos según sexo

Sexo	N° de animales	Positivos a Anticuerpos contra VHE-1/VHE-4	
		n°	%
Machos	451	224	49.7
Hembras	374	179	47.9
Total	825	403	48.9

Grafico 1. Comparación de seroprevalencia del virus de la Rinoneumonitis Equina entre departamentos del Perú



Cuadro 9. Seroprevalencia del virus de la Rinoneumonitis Equina en caballos según su actividad mediante la prueba de neutralización viral. Lima 2012-2013

Actividad	N° de equinos	Positivo a Anticuerpo contra VHE-1/VHE-4	
		n°	IC %
Caballo de trabajo o tiro	703	324	46.1 ± 3.7
Caballo Peruano de Paso	69	41	59.4 ± 11.6
Caballo de carrera	10	9	90.0 ± 18.6
Caballo deportivo	15	10	66.7 ± 23.9
Sin especificar	28	19	67.9 ± 17.3
TOTAL	825	403	48.9 ± 3.4

Cuadro 10. Distribución de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la Rinoneumonitis Equina de los caballos reactivos según tipo de actividad (n°= 403). Lima, 2012 – 2013

Actividad	Títulos de anticuerpos					
	1:2 - 1:8		1:16 - 1:64		1:128 - >1:256	
	n°	%	n°	%	n°	%
Caballo de trabajo o tiro	188	46.7	94	23.3	42	10.4
Caballo Peruano de Paso	26	6.5	11	2.7	4	1.0
Caballo de carrera	9	2.2	0	0.0	0	0.0
Caballo deportivo	7	1.7	3	0.7	0	0.0
Sin especificar	6	1.5	11	2.7	2	0.5
TOTAL	236	58.6	119	29.5	48	11.9

El análisis de regresión logística de cada variable independiente (sexo, lugar de procedencia y tipo de actividad) con respecto a la variable dependiente “anticuerpos contra el VHE-1/VHE-4” (Estatus sanitario), (Anexo A1) se observa que la variable sexo no afecta a la presencia de anticuerpos contra el virus. A diferencia, la variable tipo de actividad que afecta significativamente en la presentación de anticuerpos contra el virus herpes equino 1-4, siendo el factor de riesgo de 8.8, 2.3 y 3.2 para los caballos de carrera, caballos peruano de paso y caballos dedicado al deporte respectivamente, comparado a los caballo de trabajo o tiro. Con respecto a la variable lugar de procedencia, presenta un factor de riesgo de 3.7 veces más de presentar anticuerpos contra el VHE-1/VHE-4 para los caballos de la región del centro del país en comparación con la región del nor-este del país.

V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que el virus herpes equino tipo 1- 4 (VHE-1/VHE-4), está presente en la población de caballos del país con una seroprevalencia de $48.9 \pm 3.4\%$. (403/825). El promedio de la seroprevalencia detectada en los caballos de ambos sexos y todos los departamentos del país es similar indicando que el VHE-1-/VHE-4 está ampliamente difundido en la población de caballos en el país (Cuadros 5, 6 y 7). En un estudio realizado en caballos de carrera, equitación y caballos peruano de paso de la provincia de Lima, Rios et al. (2002) también encontró una seroprevalencia similar (44.2%). Así mismo, Cunha et al. (2002) reportó una seroprevalencia de 27.2% del VHE-1/VHE-4 en caballos del municipios del noreste de la ciudad de São Paulo. En Colombia en caballos del Valle de Aburrá y Oriente cercano a Antioquia se reportaron seroprevalencias de VHE-1 y VHE-4, de 98.7 y 96.6% respectivamente utilizando la prueba de ELISA (Ruíz Sáenz et al., 2008). Cabe mencionar que en otros países como en Argentina (Galosi et al., 1998) y Chile (Berrios et al., 2002) también se han realizado estudios de prevalencia del virus herpes equino con similares resultados.

Esta amplia distribución del VHE-1/VHE-4 en la población de caballos del país podría deberse, en parte, al libre movimiento interno de caballos ya que el virus herpes equino no es restrictivo para el movimiento de los équidos en general, así como también al carácter subclínico de la enfermedad en caballos adultos (Goodman et al., 2012) ya que los caballos tuvieron apariencia normal en el momento de muestreo. Como en

todas las infecciones herpéticas luego de la infección primaria, el virus puede permanecer en estado de latencia en el ganglio trigémino y en los tejidos linforeticular y leucocitos en casi el 80% de los caballos aunque estos animales se encuentran en un estado fisiológicamente normal (Borchers et al., 1999). Sin embargo bajo condiciones de estrés como el transporte, malas condiciones de manejo, preñez, desnutrición, etc., el virus puede reactivarse e infectar a otros caballos, y así mantenerse en la población (Goodman et al., 2007; Walter et al., 2013).

A pesar de la amplia distribución de la infección por el VHE-1/VHE-4 en los caballos del país, existen escasos reportes sobre la ocurrencia de casos clínicos compatibles con rinoneumonitis equina o aborto equino. Clínicamente brotes de problemas respiratorios son frecuentes en animales jóvenes de muchos Haras de Lima (Oballe, Lima, comunicación personal) pero no se han realizado estudios para determinar la participación del VHE-1/VHE-4 en estos procesos respiratorios. Existe solo un reporte de un brote de abortos por el VHE-1/VHE-4 en donde el 76% (13/17) de la yeguas abortaron en un corto periodo de tiempo (Rivera et al., 1997). Usualmente la prevalencia o incidencia de los abortos en caballos son poco conocidos probablemente porque los fetos equinos abortados no son enviados a los laboratorios para su diagnóstico por problemas de logística, costos, etc., como también ocurre en algunos países (Van Maanen et al., 2000).

Los anticuerpos neutralizantes detectados en el $48.9 \pm 3.4\%$ de los caballos pudo haber sido inducido por una infección natural o por vacunación contra la rinoneumonitis equina ya que la prueba de neutralización viral no discrimina a los anticuerpos inducidos por virus de campo o por vacuna (Cuadro A1) (Van Oirschot et al., 1996). Los criadores de caballos dedicados a actividades de exhibición o deporte como los caballos de carrera y actualmente los caballos peruano de paso son regularmente vacunados contra el VHE-1/VHE-4 para prevenir problemas respiratorios en los animales jóvenes y abortos en las yeguas por lo que los anticuerpos detectados podrían ser de origen vacunal. Los anticuerpos detectados en el 46.1% (Cuadro 9) de los caballos criollo de trabajo o tiro podrían haber sido inducidos por el virus de campo ya que usualmente estos animales no reciben vacunación contra el VHE-1/VHE-4 u otras enfermedades virales.

En el presente estudio el 58.6% de los caballos tuvieron anticuerpos neutralizantes con títulos entre 2 a 8 y 29.5% entre 16 a 64 (Cuadro 10), similar a los títulos detectados en caballos de la provincia de Lima donde el 65% tuvieron anticuerpos entre 2 a 8 y 30% entre 16 y 64 (Rios et al., 2002). Este nivel de anticuerpos son detectados en infecciones herpéticas al utilizar la prueba de neutralización, sugiriendo reacciones cruzadas entre VHE-1 y VHE-4 (Paweska et al., 1994) o anticuerpos detectados en estadios tempranos o tardíos producto de reactivaciones o infecciones naturales (Smith, 1997). El 11.9% de los caballos tuvieron títulos de anticuerpos entre 128 a mayor a 256 de los cuales el 10.4% correspondió a caballos de trabajo o tiro (Cuadro 10). Los títulos de 128 o más indican una infección activa o reciente, tal vez producto de reactivaciones o infecciones respiratorias agudas pero no reportadas, aunque existen evidencias de que los niveles de anticuerpos neutralizantes no previenen la viremia asociada a células siendo la inmunidad celular de mayor relevancia en infecciones herpéticas (Allen et al., 1999). Rivera et al. (1997) detectó altos títulos de anticuerpos neutralizantes durante un brote de abortos indicando que infecciones agudas inducen altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes de tipo IgG persisten en títulos moderados o altos por un año o más, por lo que esta prueba es muy importante para la vigilancia epidemiológica del herpes virus equino (Van Maanen, 2002).

Respecto a la inmunidad humoral en infecciones herpéticas existen aún divergencias. Algunos autores manifiestan que después de una infección primaria con el VHE-1/VHE-4 el animal desarrolla anticuerpos neutralizantes que lo protegen contra re-infecciones durante 4 a 8 meses aunque algunos reportes indican una duración de la protección de menos de 3 meses, lo que significa que el rol protector de la IgG es de corta duración (Paillot et al., 2008). Los virus herpes incluyendo el virus herpes equino 1- 4, infectan inicialmente células epiteliales de la superficie de la mucosa oro-nasal difundiendo intracelularmente a los pulmones y nódulos retrofaríngeos, submaxilares en corto tiempo y antes que haya viremia (Kydd et al., 1994), por lo tanto, la inmunidad mucosal de tipo Ig A es más importante en la protección inicial.

La prueba de neutralización viral utilizada en el presente estudio es la prueba estándar contra la cual se han estandarizado otras pruebas más sensibles como las de inmunoperoxidasa, ELISA y las pruebas moleculares. No existen datos de su especificidad y sensibilidad para el caso de diagnóstico del VHE-1/VHE-4 pero es una prueba que posee una especificidad del 100% aunque su sensibilidad puede variar dependiendo del cultivo celular utilizado como sistema indicador y continúa siendo una prueba alternativa para el diagnóstico del herpes equino (Paillot et al., 2008; OIE, 2012).

El análisis de regresión logística (Apéndice 1) indica que el tipo de actividad de los caballos es un factor de riesgo asociado a la infección por el VHE-1/VHE-4 ya que para los caballos de carrera el factor de riesgo fue de 8.8 veces más que para los caballos de trabajo o tiro, así mismo, para los caballos peruano de paso y los de deporte el factor de riesgo fueron de 2.3 y 3.2 veces más respectivamente comparado con los caballos de trabajo o tiro. Este mayor riesgo puede deberse a un mayor contacto entre los caballos, competencias internacionales, al intenso estrés en caso de los caballos de carrera y también a las vacunaciones. Respecto al lugar de procedencia de los caballos, solo en aquellos provenientes del centro del país presentaron un factor de riesgo de 3.7 veces mayor de presentar anticuerpos contra el VHE-1/VHE-4 en comparación con los que caballos provienen de los departamentos del nor-este, pues los caballos de estos departamentos tuvieron una seroprevalencia del virus superior al 50% con excepción de los caballos del departamento de Ucayali (40%) y Madre de Dios (0%) (Cuadro 6).

Lo resultados del análisis indican que estas diferencias pueden deberse a múltiples factores, citando como ejemplo a la ubicación geográfica, pues hay departamentos de difícil acceso como lo son la mayoría de departamentos de la selva del país que hace más difícil el traslado de animales portadores de la enfermedad. En este estudio, a diferencia del estudio realizado por Ríos et al. (2002), el tipo de actividad y el lugar de procedencia si significaron un factor de riesgo posiblemente debido a que las muestras fueron colectadas a lo largo de todo el territorio peruano.

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados del presente estudio confirman la presencia de los virus causales de la Rinoneumonitis equina (VHE-1/VHE-4) en los caballos criados en los distintos departamentos del Perú con seroprevalencias similares.
- Los anticuerpos neutralizantes contra el VHE-1/VHE-4 tuvieron un rango de 2 a mayor a 256.
- El tipo de actividad y la procedencia de los equinos es un factor de riesgo para la presentación de infecciones por Rinoneumonitis equina en el Perú. El sexo no es un factor de riesgo para la misma.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Allen GP, Kydd JH, Slater JD, Smith KC. 1999.** Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equine herpesvirus abortion. In: Wernery U, Wade JF, Mumford JA, Kaaden OR, eds. Equine Infectious Diseases VIII. Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai 23–26 March 1998. R & W Publications. Newmarket. p. 129–146.
2. **Allen GP, Timoney PJ. 2007.** Recent advances in our understanding of equine herpesvirus-1 (EHV-1) myeloencephalopathy. In: Richey M, eds. Proceedings of the 111th Annual Meeting of the United States Animal Health Association Richardson Printing, Kansas City. MO. p. 373–380.
3. **Allen GP. 2008.** Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *Am J Vet Res* 69(12): 1595-600.
4. **Allen WR, Stewart F. 1993.** Equine chorionic gonadotropin. In: McKinnon AO, Voss JL, eds. Equine Reproduction. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 81-96.
5. **Anonymous. 2007.** Equine herpesvirus myeloencephalopathy: a potentially emerging disease. In: USDA-APHIS, eds. APHIS Veterinary Services Center for Epidemiology and Animal Health. Washington, DC, USDA. p. 40–43.
6. **Asbury AC, LeBlanc MM. 1993.** The Placenta. In: McKinnon AO, Voss JL, eds. Equine Reproduction. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 509-516.

7. **Audibert FM, Lise LD. 1993.** Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* 14(5): 174–178.
8. **Bender BS, Small PAJ. 1992.** Influenza: pathogenesis and host defense. *Semin Respir Infect* 7: 38–45.
9. **Berrios PE. 2002.** Antecedentes en Chile de enfermedades virales de los animales domésticos. II. Enfermedades de presentación clínica y de alta seroprevalencia. *Avan Cienc Vet* 17: 3-13.
10. **Boelaert F, Biront P, Soumare B, Dispas M, Vanopdenbosch E, Vermeersch JP, Raskin A, Dufey J, Berkvens D, Kerkhofs P. 2000.** Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Prev Vet Med* 45(3-4): 285-295.
11. **Borchers K, Wolfinger U, Ludwing H. 1999.** Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. *J Gen Virol* 80: 2165-2171.
12. **Breathnach CC, Yeargan MR, Timoney JF, Allen GP. 2006.** Detection of equine herpesvirus-specific effector and memory cytotoxic immunity in the equine upper respiratory tract. *Vet Immunol Immunopathol* 111(1-2): 117-125.
13. **Bürki F, Rossmannith W, Nowotny N, Pallan C, Möstl K, Lussy H. 1990.** Viraemia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses. *Vet Q* 12(2): 80–86.
14. **Carvalho R, Passos LMF, Oliveira AM, Henry M, Martins AS. 2000.** Detection of equine herpesvirus 1 DNA in a single embryo and in horse semen by polymerase chain reaction. *Arq Bras Med Vet Zootec* 52(4): 302-306.
15. **Cathcart MP, Murcia PR. 2012.** Hide and seek: Diagnosing equine viral diseases using molecular biology techniques. *Equine Vet J* 44(4): 379-381.
16. **Chen D, Payne LG. 2002.** Targeting epidermal Langerhans cells by epidermal powder immunization. *Cell Res* 12: 97–104.
17. **Chesters PM, Allsop R, Purewal, Edington N. 1997.** Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus-1 in equine leukocytes but no trigeminal ganglia. *J Virol* 71(5): 3437-3443.
18. **Chong YC, Duffus WPH. 1992.** Immune responses of specific pathogen free foals to EHV-1 infection. *Vet Microbiol* 32(3-4): 215-228.

- 19. Csellner H, Walker C, Wellington JE, McLure LE, Love DN, Whalley JM. 2000.** EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol* 145(11): 2371-2385.
- 20. Code of Practice 2013. 2013.** Kildare-Irlanda: Irish Thoroughbred Breeders' Association. [Internet], [19 mayo 2013]. Disponible en: <http://www.itba.ie/>
- 21. Crabb BS, Studdert MJ. 1993.** Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. *J Virol* 67(10): 6332–6338.
- 22. Crabb BS, Studdert MJ. 1995.** Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv Virus Res* 45: 153-190.
- 23. Crabb BS, MacPherson CM, Reubel GH, Browning GF, Studdert MJ, Drummer HE. 1995.** A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch Virol* 140(2): 245-258.
- 24. Cullinane AA, Rixon FJ, Davison AJ. 1988.** Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. *J Gen Virol* 69(Pt 7): 1575-1590.
- 25. Cunha ESM, Ferrari CI, Lara M do CASH, da Silva LHQ. 2002.** Presença de anticorpos contra o herpesvirus equino 1 (HVE-1) em equinos do noroeste do Estado de São Paulo. *Arq Inst Biol* 69(1):1-5.
- 26. Daniel W. 1994.** Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 5^{ta} edición. Uteha Noriega editores, México. p. 197, 198, 205 y 206.
- 27. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. 2009.** The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154(1): 171-177.
- 28. De Regge N, Van Opdenbosch N, Nauwynck HJ, Efstathiou S, Favoreel HW. 2010.** Interferon alpha induces establishment of alphaherpesvirus latency in sensory neurons *in vitro*. *PLoS ONE* 5(9): e13076. doi: 10.1371/journal.pone.0013076.
- 29. Dixon PM, McGorum BC. 1997.** Clinical immunology of the equine respiratory tract. In: Rantanen NW, Hauser ML, eds. *Proceedings of the Dubai International Equine Symposium: The Diagnosis and Treatment of Respiratory Disease*. Matthew R. Rantanen Design, San Diego. p. 69–88.

- 30. Edington N, Smyth B, Griffiths L. 1991.** The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV1) abortions. *J Comp Path* 104(4): 379-387.
- 31. Edington N, Welch HM, Griffiths L. 1994.** The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine vet J* 26(2): 140-142.
- 32. Elia G, Decaro N, Martella V, Campolo M, Desario C, Lorusso E, Cirone F, Buonavoglia C. 2006.** Detection of equine herpesvirus type 1 by real time PCR. *J Virol Methods* 133(1): 70-75.
- 33. Ellis JA, Bodgan JR, Kanara EW, Morley PS, Haines DM. 1995.** Cellular and antibody responses to equine herpesviruses 1 and 4 following vaccination of horses with modified-live and inactivated viruses. *J Am Vet Med Assoc* 206(6): 823-832.
- 34. Equine Herpesvirus 1 & 4 Related Diseases. 2013.** Lexington-USA. American Association of Equine Practitioners. [Internet], [13 noviembre 2013]. Disponible en: <http://www.aaep.org>
- 35. Equine Herpesvirus (EHV). 2013.** USA: The Horse. [Internet], [19 mayo 2013]. Disponible en: <https://www.thehorse.com>
- 36. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. 1993.** DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11478–11482.
- 37. Frey R, Lieb A. 1990.** Enzootischer Virusabort auf einem Gestüt in der Ostschweiz. *Schweiz Arch Tierheilk* 132(7): 385-391.
- 38. Galosi CM, Norimine J, Echeverria MG, Oliva GA, Nosetto EO, Etcheverrigaray ME, Tohya Y, Mikami T. 1998.** Diversity of genomic electropherotypes of naturally occurring equine herpesvirus 1 isolates in Argentina. *Braz J Med Biol Res* 31(6):771-774.
- 39. Gentry PA, Feldman BF, O'Neill SL, Madigan JE, Zinkl JG. 1992.** Evaluation of the haemostatic profile in the pre- and post parturient mare, with particular focus on the perinatal period. *Equine Vet J* 24(1): 33-36.
- 40. Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN. 1999a.** Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in thoroughbred foals: a

review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Vet Microbiol* 68(1-2): 15-25.

- 41. Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN. 1999b.** Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foals population on the Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Vet Microbiol* 68(1-2): 27-34.
- 42. Goehring LS, Van Winden SC, Van Maanen C, Sloet, Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. 2006.** Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: a four-year retrospective study (1999–2003). *J Vet Inter Med* 20(3): 601–607.
- 43. Goodman LB, Loregian A, Perkins GA, Nugent J, Buckles EL, Mercorelli B, Kydd JH, Palù G, Smith KC, Osterrieder N, Davis-Poynter N. 2007.** A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog* , 3(11):e160.
- 44. Goodman LB, Wimer C, Dubovi EJ, Gold C, Wagner B. 2012.** Immunological correlates of vaccination and infection for equine herpesvirus 1. *Clin Vaccine Immunol* 19(2): 235-241.
- 45. Gordon J. 2001.** The horse industry. Rural Industries Research & Development Corporation. [Internet], [27 de Diciembre 2013]. Disponible en: <http://www.horsecouncil.org.au/ahic/index.cfm/topics/surveys/the-horse-industry-contributing-to-the-australian-economy/>
- 46. Goodwin D. 1999.** The importance of ethology in understanding the behaviour of the horse. *Equine Vet J Suppl* 28: 15-19.
- 47. Hannant D, Mumford JA, Jessett DM. 1988.** Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus. *Vet Rec* 122(6): 125–128.
- 48. Hartley WJ, Dixon RJ. 1979.** An outbreak of foal perinatal mortality due to equid herpesvirus type 1: pathological observations. *Equine Vet J* 11(4): 215-218.
- 49. Henninger RW, Reed SM, Saville WJ, Allen GA, Hass GF, Kohn CW, Sofaly C. 2007.** Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J Vet Int Med* 21(1): 157–165.

50. [INEI] Instituto Nacional de Estadísticas e Informática. 1994. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú. III Censo Nacional Agropecuario – Resultados definitivos. Tomo IV. p. 2407- 2414.
51. Jackson TA, Osburn BI, Cordy DR, Kendrick JW. 1977. Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. Am J Vet Res 38(6): 709-719.
52. [Johnson DC, Baines JD. 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. Nat Rev Microbiol 9\(5\): 382-394.](#)
53. [Kimura T, Hasebe R, Mukaiva R, Ochiai K, Wada R, Umemura T. 2004. Decreased expression of equine herpesvirus-1 early and late genes in the placenta of naturally aborted equine fetuses. J Comp Path 130\(1\): 41-47.](#)
54. [Kohn CW, Reed SM, Sofaly CD, Henninger RW, Saville WJ, Allen GP, Premanadan C. 2006. Transmission of EHV1 by horses with EHV1 myeloencephalopathy: implications for biosecurity and review. Clinical Techniques in Equine Practice 5\(1\): 60–66.](#)
55. [Kondo T, McGregor M, Chu Q, Chen D, Horimoto T, Kawaoka Y. 2004. A protective effect of epidermal powder immunization in a mouse model of equine herpesvirus-1 infection. Virology 318: 414-419.](#)
56. [Kydd J, Antczak DF, Allen WR, Barbis D, Butcher G, Davis W, Duffus WP, Edington N, Grünig G, Holmes MA, Lunn DP, McCulloch J, O'Brien A, Perryman LE, Tavernor A, Williamson S, Zhang C. 1994. Report of the First International Workshop on equine leucocyte antigens, Cambridge, UK, July 1991. Vet Immunol Immunopathol 42\(1\): 3-60.](#)
57. Kydd JH, Watrang E, Hannant D. 2003. Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares. Vet Immunol Immunopathol 96(3-4): 207–217.
58. Léon A, Fortier G, Fortier C, Freymuth F, Tapprest J, Leclercq R, Pronost S. 2008. Detection of equine herpesviruses in aborted foetuses by consensus PCR. Vet Microbiol 126(1-3): 20–29.

- 59. Lunn DP, Soboll G, Breathnach CC. 2006.** Immunology and Immunopathology. In: McGorum B, Dixon PM, Robinson NE, Schumacher J, eds. *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. 1st ed. Philadelphia-USA: Elsevier. p. 71-81.
- 60. Mair TS, Batten EH, Stokes CR, Bourne FJ. 1987.** The histological features of the immune system of the equine respiratory tract. *J Comp Pathol* 97(5): 575–586.
- 61. Mair TS, Batten EH, Stokes CR, Bourne FJ. 1988a.** The distribution of mucosal lymphoid nodules in the equine respiratory tract. *J Comp Pathol* 99(2): 159–168.
- 62. Mair TS, Stokes CR, Bourne FJ. 1988b.** Immunohistochemical study of the local humoral immune system of the equine respiratory mucosa. *Res Vet Sci* 45(2): 160–165.
- 63. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME Fletcher D, Nedrud JG. 1992.** Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(15): 6901–6905.
- 64. Matsumura T, Sugiura T, Imagawa H, Fukunaga Y, Kamada M. 1992.** Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. *J Vet Med Sci* 54(2): 207-211.
- 65. McCulloch J, Williamson SA, Powis SJ, Edington N. 1993.** The effect of EHV-1 infection upon circulating leucocyte populations in the natural equine host. *Vet Microbiol* 37(1-2): 147-161.
- 66. Mestecky J, Blumberg RS, Kiyono H, McGhee JR. 2003.** The mucosal immune system. In: Paul WE (editor). *Fundamental Immunology*. 5th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. p. 965–1020.
- 67. Mukaiya R, Kimura T, Ochiai K, Wada R, Umemura T. 2000.** Demonstration of equine herpesvirus-1 gene expression in the placental trophoblasts of naturally aborted equine fetuses. *J Comp Pathol* 123(2-3): 119–125.
- 68. Mumford JA, Rossdale PD, Jessett DM, Gann SJ, Ousey J, Cook RF. 1987.** Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J Reprod Fert Suppl* 35: 509-518.
- 69. Nugent J, Birch-Machin I, Smith KC, Mumford JA, Swann Z, Newton JR, Bowden RJ, Allen GP, Davis-Poynter N. 2006.** Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with

neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. J Virol 80(8): 4047-4060.

70. [\[OIE\] Office International des Epizooties. 2012. Equine Rhinopneumonitis. Paris: OIE. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. p 894-903.](#)
71. O'Neill T, Kydd JH, Allen GP, Wattranq E, Mumford JA, Hannant D. 1999. Determination of equid herpesvirus 1-specific, CD8+, cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies in ponies. Vet Immunol Immunopathol 70(1-2): 43–54.
72. Oehen S, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1991. Vaccination for disease. Science 251(4990): 195–198.
73. Ostlund EN. 1993. The equine herpesviruses. Vet Clin North Am Equine Pract 9(2): 283–294.
74. Ostlund PN, Powell D, Bryans JT. 1991. Equine herpesvirus 1: a review. Progress in American Association of Equine Practitioners 36: 387-395.
75. Paillot R, Case R, Ross J, Newton R, Nugent J. 2008. Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. Open Vet Sci J 2:68-91.
76. Patel JR, Heldens J. 2005. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. Vet J 170(1): 14–23.
77. Paweska JT, Gerdes T, Van Heerden J. 1994. Serological relationship between a donkey alphaherpesvirus (isolate M7/91) and equid herpesvirus type 1 and 4. J S Afr Vet Assoc 65(2): 64-66.
78. [Perkins G, Ainsworth DM, Erb HN, Del Piero F, Miller M, Wilkins PA, Palmer J, Frazer M. 1999. Clinical, haematological and biochemical findings in foals with neonatal equine herpesvirus-1 infection compared with septic and premature foals. Equine Vet J 31\(5\): 422-426.](#)
79. Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP, Sibille Y. 2001. Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. Eur Respir J 18(3): 571–588.
80. [Pusterla N, Wilson WD, Madigan JE, Ferraro GL. 2009. Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: A review of recent developments.](#) Vet J 180(3): 279-289.
81. Rajcáni J, Vojvodová A. 1998. The role of herpes simplex virus glycoproteins in the virus replication cycle. Acta Virol 42(2): 103–118.

82. [Ríos P. 2002. Rinoneumonitis equina en caballos del valle de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 38 p.](#)
83. [Rivera H, Samamé H, Oballe R. 1975. Aislamiento y caracterización de un virus aislado de feto equino abortado. Rev Vet Zootec 126: 10-13.](#)
84. [Rivera H, Alvitres R, Manchego A, Sandoval N, Rosadio R. 1997. Aborto por virus herpes equino. Ver Inv Pec IVITA \(Perú\) 8 \(1\): 49-55.](#)
85. [Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckestein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. The Hespervirus Study Group of the international Committee on Taxonomy of viruses. Arch Virol 123\(3-4\): 425-449.](#)
86. Ruitenberg KM, Love DN, Gilkerson JR, Wellington JE, Whalley JM. 2000a. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein D DNA inoculation in horses with pre-existing EHV-1/EHV-4 antibody. Vet Microbiol 76(2): 117– 127.
87. Ruitenberg KM, Walker C, Love DN, Wellington JE, Whalley JM. 2000b. A prime-boost immunization strategy with DNA, recombinant baculovirus-expressed protein enhances protective immunogenicity of glycoprotein D of equine herpesvirus 1 in naive and infection-primed mice. Vaccine 18(14): 1367–1373.
88. Ruíz-Sáenz J, Góez Y, Urcuqui-Inchima S, Góngora A, López A. 2008. Serologic evidence of equine herpesvirus 1 and 4 infection in two regions of Colombia. Rev Colom Cienc Pecua 21(2): 251-258.
89. Segura JC, Honhold N. 2000. Métodos de muestreo para la producción y la salud animal. Yucatán-México. Universidad Autónoma de Yucatán. 160 p.
90. Slater JD, Baxi M, Tewari D, Gibson JS, Field HJ, Ludwig H, Steinbach F, Borchers K. 1994a. Experimental infection of specific pathogen-free ponies with equid herpesvirus-1: detection of infectious virus and viral DNA. In: Nakajima H, Plowright W, eds. Equine Infectious Diseases VII: Proceedings of the Seventh International conference, Tokyo. Newmarket: R & W Publications. p. 255-260.
91. Slater JD, Borchers K, Thackray AM, Field HJ. 1994b. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. J Gen Virol 75(Pt 8): 2007– 2016.
92. Slater J, Hannant D. 2000. Equine immunity to viruses. Vet Clin North Am Equine Pract 16(1): 49–68.

93. Slater JD, Lunn DP, Horohov DW, Antczak DF, Babiuk L, Breathnach C, Chang Y-W, Davis-Poynter N, Edington N, Ellis S, Foote C, Goehring L, Kohn CW, Kydd J, Matsumura T, Minke J, Morley P, Mumford J, Neubauer T, O'Callaghan D, Osterrieder K, Reed S, Smith K, Townsend HGG, Van der Meulen K, Whalley M, Wilson WD. 2006. Report of the equine herpesvirus-1 Havemeyer Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 3–13.
94. Smith KC, Whitwell KE, Binns MM, Dolby CA, Hannant D, Mumford JA. 1992. Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with Equid herpesvirus 1. *Equine Vet J* 24(4): 256-259.
95. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, Gower SM, Hannant D, Tearle JP. 1993. An immunohistological study of the uterus of mares following experimental infection by equid herpesvirus 1. *Equine Vet J* 25(1): 36-40.
96. Smith KC. 1997. Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet J* 153(3): 253-268.
97. Smith KC, McGladdery AJ, Binns MM, Mumford JA. 1997. Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in utero. *Am J Vet Res* 58(9): 997-1002.
98. Smith KL, Allen GP, Branscum AJ, Cook RF, Vickers ML, Timoney PJ, Balasuriya UBR. 2010. The Increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Vet Microbiol* 141(1-2): 5-11.
99. [Soboll G, Hussey SB, Whalley JM, Allen GP, Koen MT, Santucci N, Fraser DG, Macklin MD, Swain WF, Lunn DP. 2006. Antibody and cellular immune responses following DNA vaccination and EHV-1 infection of ponies. *Vet Immunol Pathol* 111\(1-2\): 81-95.](#)
100. [Soboll G, Breathnach CC, Kydd JH, Hussey SB, Mealey RM, Lunn DP. 2010. Vaccination of ponies with the IE gene of EHV-1 in a recombinant modified live vaccinia vector protects against clinical and virological disease. *Vet Immunol Pathol* 135\(1-2\): 108-117.](#)
101. Szeredi L, Aupperle H, Steiger K. 2003. Detection of equine herpesvirus-1 in the fetal membranes of aborted equine fetuses by immunohistochemical and *in-situ* hybridization techniques. *J Comp Path* 129(2-3): 147-153.

- 102. Tearle JP, Smith KC, Boyle MS, Binns MM, Livesay GJ, Mumford JA. 1996.** Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infectious virus. *J Comp Pathol* 115(4): 385-397.
- 103. Telford EAR, Watson MS, Perry J, Cullinane AA, Davison AJ. 1998.** The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *J Gen Virol* 79(Pt 5): 1197-1203.
- 104. Tewari D, Gibson JS, Slater JD, O'Neill T, Hannant D, Allen GP, Field HJ. 1993.** Modulation of the serological response of specific pathogen-free (EHV-free) foals to EHV-1 by previous infection with EHV-4 or a TK-deletion mutant of EHV-1. *Arch. Virol* 132(1-2): 101-120.
- 105. Torfason EG, Thorsteinsdóttir L, Torsteinsdóttir S, Svansson V. 2008.** Study of equid herpesviruses 2 and 5 in Iceland with a type-specific polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 85(3): 605-611.
- 106. Van Der Meulen KM, Nauwynck HJ, Buddaert W, Pensaert MB. 2000.** Replication of equine herpesvirus type 1 in freshly isolated equine peripheral blood mononuclear cells and changes in susceptibility following mitogen stimulation. *J Gen Virol* 81(Pt 1): 21-25.
- 107. Van de Walle GR, Goupil R, Wishon C, Damiani A, Perkins GA, Osterrieder N. 2009.** A single nucleotide polymorphism in a herpesvirus DNA polymerase is sufficient to cause lethal neurological disease. *J Infect Dis* 200(1): 20-25.
- 108. Van Maanen C, Willink DL, Smeenk LA, Brinkhof J, Terpstra C. 2000.** An equine herpesvirus 1 (EHV1) abortion storm at a riding school. *Vet Q* 22(2): 83-87.
- 109. Van Maanen C, Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Damen EA, Derksen AG. 2001.** Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet J* 33(2): 191-196.
- 110. Van Maanen C. 2002.** Equine herpesvirus 1 and 4 infections: An update. *Vet Q* 24(2): 58-78.
- 111. Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM. 1996.** Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet Microbiol* 53(1-2): 43-54.

- 112. Virus Taxonomy: 2012 Release. 2012.** International Committee on Taxonomy of Viruses. [Internet], [6 de Marzo 2013]. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
- 113. Walker C, Love DN, Whalley JM. 1999.** [Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 \(EHV-1\) infection in the horse and the mouse model: a review. Vet Microbiol 68\(1-2\): 3-13.](#)
- 114. Walter J, Seeh, Fey K, Bleul U, Osterrieder N. 2013.** [Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. Acta Vet Scand 55\(1\): 19.](#)
- 115. Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griggith L, Edington N. 1992.** [Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. J Gen Virol 73\(Pt 2\): 261-268.](#)
- 116. Whitwell KE, Blunden AS. 1992.** Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection. *Equine Vet J* 24(1): 13-19.
- 117. Wilkes RP. 2013.** Herpesviridae. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. *Veterinary Microbiology*. 3rd ed. EEUU. Wiley Blackwell. p. 372-386.
- 118. Wilson WD. 1997.** Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 13(1): 53-72.
- 119. Yasunaga S, Maeda K, Matsumura T, Kai K, Iwata H, Inoue T. 1998.** Diagnosis and sero-epizootiology of equine herpesvirus type 1 and type 4 infections in Japan using a type-specific ELISA. *J Vet Med Sci* 60(10): 1133-1137.

IX. APÉNDICE

Cuadro A1. Distribución de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la Rinoneumonitis Equina de los caballos reactivos según procedencia (n°= 403). Lima, 2012 – 2013

Departamento de Procedencia	Títulos de Anticuerpos					
	1:2 - 1:8		1:16 - 1:64		1:128 - >1:256	
	n°	%	n°	%	n°	%
Amazonas	18	51.4	0	0.0	0	0.0
Ancash	11	27.5	8	20.0	11	27.5
Apurímac	30	40.0	3	4.0	1	1.3
Arequipa	2	13.3	0	0.0	1	6.7
Ayacucho	12	30.0	4	10.0	0	0.0
Cajamarca	37	28.5	15	11.5	1	0.8
Cusco	12	14.1	2	2.4	0	0.0
Huancavelica	17	34.0	19	38.0	2	4.0
Huánuco	13	28.9	11	24.4	2	4.4
Ica	0	0.0	2	20.0	5	50.0
Junín	0	0.0	5	25.0	14	70.0
La Libertad	23	57.5	9	22.5	0	0.0
Lambayeque	5	33.3	0	0.0	0	0.0
Lima-Callao	2	10.0	12	60.0	3	15.0
Loreto	0	0.0	0	0.0	1	20.0
Madre de Dios	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Moquegua	0	0.0	4	80.0	0	0.0
Pasco	9	60.0	1	6.7	0	0.0
Piura	10	12.5	13	16.3	7	8.8
Puno	20	50.0	9	22.5	0	0.0
San Martín	6	15.0	2	5.0	0	0.0
Tacna	5	100.0	0	0.0	0	0.0
Tumbes	2	40.0	0	0.0	0	0.0
Ucayali	2	40.0	0	0.0	0	0.0
TOTAL	236	58.6	119	29.5	48	11.9

Apéndice1. Análisis de regresión logística de variables independientes “Sexo”, “Lugar” y “Tipo de actividad” con respecto a la variable dependiente “Estatus sanitario” con el programa STATA 12.0

_____ (R)
 /_ / _/ / _/
 __/ / /_/ / /_/ 12.0 Copyright 1985-2011 StataCorp LP
 Statistics/Data Analysis StataCorp
 4905 Lakeway Drive
 College Station, Texas 77845 USA
 800-STATA-PC <http://www.stata.com>
 979-696-4600 stata@stata.com
 979-696-4601 (fax)

21-student Stata lab perpetual license:

Serial number: 30120536946

Licensed to: Sección de Virología, Laboratorio de Microbiología y Parasitología
 FMV-UNMSM

Notes:

*(6 variables, 825 observations pasted into data editor)

- var1: Identificación
- var2: Título
- var3: Sexo
- var4: Actividad
- var5: Lugar
- var6: Estatus

. logistic Estatus Sexo

Logistic regression

Number of obs = 825

LR chi2(1) = 0.27

Prob > chi2 = 0.61

Log likelihood = -571.49

Pseudo R2 = 0.00

Estatus	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z 	[95% Conf. Interval]	
Sexo	0.93	0.13	-0.52	0.61	0.71	1.22
_cons.	1.06	0.23	0.27	0.78	0.70	1.62

. logistic Status i.Lugar

Logistic regression

Number of obs = 825

LR chi2(2) = 53.23

Prob > chi2 = 0.00

Log likelihood = -545.01

Pseudo R2 = 0.05

Categorías de Lugar:

- 1) Región Nor-este del país
- 2) Región Centro del país
- 3) Región Sur-este del país

Estatus	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z 	[95% Conf. Interval]	
Lugar						
2	3.30	0.62	6.30	0.00	2.28	4.79
3	0.92	0.15	-0.46	0.64	0.67	1.28
_cons.	0.74	0.08	-2.77	0.01	0.60	0.92

. logistic Estatus i.Actividad

Logistic regression

Number of obs = 825

LR chi2(4) = 19.05

Prob > chi2 = 0.00

Log likelihood = -562.10

Pseudo R2 = 0.02

Categorías de actividad:

- 1) Caballo de trabajo o tiro (CTT)
- 2) Caballo Peruano de Paso (CPP)
- 3) Caballo de Carrera (CC)
- 4) Caballo Deportivo (CD)

5) Sin Especificar (SE)

Estatus	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Actividad						
2	1.71	0.44	2.10	0.04	1.04	2.83
3	10.53	11.13	2.23	0.03	1.33	83.54
4	2.34	1.29	1.54	0.12	0.79	6.91
5	2.47	1.02	2.20	0.03	1.10	5.53
_cons.	0.85	0.65	-2.07	0.04	0.74	0.99

. logistic Estatus Sexo i.Lugar i.Actividad

Logistic regression

Number of obs = 825

LR chi2(7) = 73.60

Prob > chi2 = 0.00

Log likelihood = -534.83

Pseudo R2 = 0.06

Estatus	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
Sexo	1.00	0.15	0.03	0.98	0.75	1.34
Lugar						
2	3.70	0.75	6.48	0.00	2.49	5.49
3	0.99	0.17	-0.09	0.93	0.71	1.37
Actividad						
2	2.30	0.61	3.15	0.00	1.37	3.886
3	8.88	9.56	2.03	0.04	1.08	73.24
4	3.20	1.78	2.09	0.04	1.08	9.49
5	1.18	0.52	0.38	0.70	0.50	2.81
_cons.	0.62	0.16	-1.89	0.06	0.38	1.02